



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0123299
(43) 공개일자 2012년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/08 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7017276

(22) 출원일자(국제) 2010년12월03일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2012년07월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/058958

(87) 국제공개번호 WO 2011/069104
국제공개일자 2011년06월09일

(30) 우선권주장
61/267,006 2009년12월04일 미국(US)
61/346,566 2010년05월20일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 임크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자
스치어, 저스틴
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 임크. 내
반들렌, 리차드 엘.
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 임크. 내

(74) 대리인
위혜숙, 양영준

전체 청구항 수 : 총 174 항

(54) 발명의 명칭 다중특이적 항체, 항체 유사체, 조성물 및 방법

(57) 요 약

적어도 2가지 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항체가 제공된다. 천연 항체 (항체 유사체)의 구조적 변이체가 또한 제공된다. 또한, 소정 범위의 생물학적 활성을 갖는 다중특이적 항체 및 항체 유사체가 제공된다. 효능제 및 길항제 다중특이적 항체 및 효능제 및 길항제 항체 유사체가 제공된다. 치료제 및/또는 진단제와 접합된 다중특이적 항체 및 항체 유사체가 또한 제공되며, 이는 이러한 작용제가 결여된 다중특이적 항체 및 항체 유사체에 비해 생체내 반감기를 증가시키기 위해 작용제와 접합된 다중특이적 항체 및 항체 유사체이다. 또한, 다중특이적 항체 및 항체 유사체의 제조 방법 및 다중특이적 항체 및 항체 유사체를 포함하는 조성물이 제공된다. 다중특이적 항체 및 항체 유사체의 치료, 연구 및 진단적 용도가 또한 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

제1 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제1 모 항체로부터 수득된 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하고, 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 제2 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제2 모 항체로부터 수득된 제2 항체 단편과 반응시켜 다중특이적 항체를 생성하며, 여기서 제1 단일특이성은 제2 단일특이성과 상이한 것인, 다중특이적 항체의 합성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1 및 항-Her2로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her2이고, 제2 모 항체가 항-Her1이거나, 또는 제1 모 항체가 항-Her1이고, 제2 모 항체가 항-Her2인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 항-Her2가 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편이 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편이 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편이 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 항-Her1이 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 9

제2항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편이 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제2항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편이 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제2항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편이 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제3항에 있어서, 항-Her2가 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되고, 항-Her1이 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 13

제3항에 있어서, 항-Her2로부터 수득된 항체 단편이 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하고, 항-Her1로부터 수득된 항체 단편이 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제3항에 있어서, 항-Her2로부터 수득된 항체 단편이 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고, 항-Her1로부터 수득된 항체 단편이 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제3항에 있어서, 항-Her2로부터 수득된 항체 단편이 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고; 항-Her1로부터 수득된 항체 단편이 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb 및 항-Fc ε RI α로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제2 모 항체가 항-Fc ε RI α이거나, 또는 제1 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제2 모 항체가 항-Fc γ RIIb인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 항-Fc γ RIIb가 5A6인 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편이 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편이 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제16항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편이 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제16항에 있어서, 항-Fc ε RI α가 22E7인 방법.

청구항 23

제16항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편이 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제16항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편이 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제16항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편이 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열

및 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제17항에 있어서, 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 항체 단편이 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하고, 항-Fc ε RI α로부터 수득된 항체 단편이 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제17항에 있어서, 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 항체 단편이 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고, 항-Fc ε RI α로부터 수득된 항체 단편이 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제17항에 있어서, 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 항체 단편이 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고; 항-Fc ε RI α로부터 수득된 항체 단편이 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제1항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미드 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 퍼리딜 디슬피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-니트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오슬포네이트로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미드인 방법.

청구항 31

제1항에 있어서, 제1 항체 단편 및/또는 제2 항체 단편이 시스테인-조작된 항체로부터 수득된 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 방법.

청구항 34

제1항에 있어서, 제1 항체 단편 및/또는 제2 항체 단편이 천연 항체로부터 수득된 것이고, 여기서 천연 항체는 펩신으로 소화되어 $F(ab')_2$ 단편을 생성하고, 상기 $F(ab')_2$ 단편은 정제되고, 환원제로 처리된 후에, Fab의 중쇄와 경쇄 사이의 디슬피드가 재형성되고 헌지 영역 내 시스테인 잔기가 산화되지 않은 상태로 남아있는 조건하에 산화제로 처리되는 것인 방법.

청구항 35

유리 슬프히드릴 기를 갖는 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하고, 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 유리 슬프히드릴 기를 갖는 제2 항체 단편과 반응시켜 항체 유사체를 생성하며, 여기서 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 단일 모 항체로부터 수득된 것인, 항체 유사체의 합성 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 모 항체가 항-Her1, 항-Her2, 항-Fc ε RI α 및 항-Fc γ RIIb로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 항-Her2가 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 중쇄 서열은 서열 4, 5 및 8로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 40

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열 및 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택되고, 중쇄 서열은 서열 4, 5 및 8로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 41

제36항에 있어서, 항-Her1이 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 42

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 43

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 중쇄 서열은 서열 17 및 20으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 44

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열 및 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택되고, 중쇄 서열은 서열 17 및 20으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 45

제36항에 있어서, 항-Fc γ RIIb가 5A6인 방법.

청구항 46

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 11 및 12로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 47

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 중쇄 서열은 서열 9 및 10으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 48

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열 및 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 11 및 12로부터 선택되고, 중쇄 서열은 서열 9 및 10으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 49

제36항에 있어서, 항-Fc ϵ RI α 가 22E7인 방법.

청구항 50

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 15 및 16으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 51

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 중쇄 서열은 서열 13 및 14로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 52

제36항에 있어서, 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열 및 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 15 및 16으로부터 선택되고, 중쇄 서열은 서열 13 및 14로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 53

제35항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미도 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 피리딜 디술피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-나트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오술포네이트로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미드인 방법.

청구항 55

제35항에 있어서, 모 항체가 시스테인-조작된 항체인 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 네모링은 EU 네모링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 네모링은 EU 네모링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 방법.

청구항 58

제35항에 있어서, 모 항체가 천연 항체이고, 여기서 천연 항체는 팝신으로 소화되어 $F(ab')_2$ 단편을 생성하고, 상기 $F(ab')_2$ 단편은 정제되고, 환원제로 처리된 후에, Fab의 중쇄와 경쇄 사이의 디술피드가 재형성되고 헌지 영역 내 시스테인 잔기가 산화되지 않은 상태로 남아있는 조건하에 산화제로 처리되는 것인 방법.

청구항 59

제35항에 있어서, 항체 유사체가 모 항체의 항원 결합 영역과 구조적으로 상이한 항원 결합 영역을 갖는 것인 방법.

청구항 60

제1항 또는 제35항에 있어서, 가교제가 보호된 SH 기를 포함하는 변형된 가교제인 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 변형된 가교제가 비스-말레이미도-아세틸아세테이트 (BMata)인 방법.

청구항 62

제60항에 있어서, 변형된 가교제를 포함하는 항체를, 관능기를 포함하는 작용제와 추가로 반응시키는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 작용제가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 알부민-결합 웨티드 (ABP), 형광 태그, 방사선영상화제, 세포독성제 및 siRNA로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 작용제가 PEG이고, 상기 PEG는 2000 mw (2K) PEG, 12,000 mw (12K) PEG 및 20,000 mw (20K) PEG로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 65

제1 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제1 모 항체로부터 수득된 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하고, 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 제1 항체 단편과 상이한 단일특이성의 하나 이상의 모 항체로부터 수득된, 각각 유리 술프히드릴 기를 갖는 2개 이상의 추가의 항체 단편과 각각 쌍으로 반응시켜 다중특이적 항체의 패널을 생성하는, 다중특이적 항체의 패널의 합성 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1, 항-Her2, 항-Fc ε RI α 및 항-Fc γ RIIb로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 제1 항체 단편이 항-Her2로부터 수득되고, 2개 이상의 추가의 항체 단편이 각각 항-Her1로부터 수득된 것이거나, 또는 제1 항체 단편이 항-Her1로부터 수득되고, 2개 이상의 추가의 항체 단편이 각각 항-Her2로부터 수득된 것이거나, 또는 제1 항체 단편이 항-Fc ε RI α로부터 수득되고, 2개 이상의 추가의 항체 단편이 각각 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 것이거나, 또는 제1 항체 단편이 항-Fc γ RIIb로부터 수득되고, 2개 이상의 추가의 항체 단편이 각각 항-Fc ε RI α로부터 수득된 것인 방법.

청구항 68

제66항에 있어서, 항-Her2가 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 69

제66항에 있어서, 항-Her1의 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 70

제67항에 있어서, 항-Her2가 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되고, 항-Her1의 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 71

제66항에 있어서, 항-Fc γ RIIb가 5A6인 방법.

청구항 72

제66항에 있어서, 항-Fc ε RI α가 22E7인 방법.

청구항 73

제67항에 있어서, 항-Fc γ RIIb가 5A6이고, 항-Fc ε RI α가 22E7인 방법.

청구항 74

제65항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미도 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 피리딜 디슬피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-니트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오술포네이트로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미드인 방법.

청구항 76

제65항에 있어서, 제1 항체 단편 및/또는 각각의 2개 이상의 추가의 항체 단편이 시스테인-조작된 항체로부터 수득된 것인 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 방법.

청구항 78

제76항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 방법.

청구항 79

유리 술프히드릴 기를 갖는 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하고, 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 각각 유리 술프히드릴 기를 갖는 2개 이상의 추가의 항체 단편과 각각 쌍으로 반응시켜 항체 유사체의 패널을 생성하며, 여기서 각각의 항체 단편은 단일 모 항체로부터 수득된 것인 항체 유사체의 패널의 합성 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 모 항체가 항-Her1, 항-Her2, 항-Fc ε RI α 및 항-Fc γ RIIb로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 항-Her2가 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 82

제80항에 있어서, 항-Her1이 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 83

제80항에 있어서, 항-Fc γ RIIb가 5A6인 방법.

청구항 84

제80항에 있어서, 항-Fc ε RI α가 22E7인 방법.

청구항 85

제79항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미도 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 피리딜 디슬피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-니트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오슬포네이트로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미드인 방법.

청구항 87

제79항에 있어서, 모 항체가 시스테인-조작된 항체인 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 방법.

청구항 89

제87항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 네모링은 EU 네모링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 방법.

청구항 90

(i) 제1 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제1 모 항체로부터 수득된 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하는 것, 및

(ii) 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 제2 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제2 모 항체로부터 수득된 제2 항체 단편과 반응시켜 다중특이적 항체를 생성하는 것

을 포함하며, 여기서 제1 단일특이성은 제2 단일특이성과 상이한 것인 방법에 의해 합성된 다중특이적 항체.

청구항 91

제90항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1 및 항-Her2로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체.

청구항 92

제91항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her2이고, 제2 모 항체가 항-Her1이거나, 또는 제1 모 항체가 항-Her1이고, 제2 모 항체가 항-Her2인 다중특이적 항체.

청구항 93

제91항에 있어서, 항-Her2가 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체.

청구항 94

제91항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편이 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 95

제91항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편이 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 96

제91항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편이 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 97

제91항에 있어서, 항-Her1이 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체.

청구항 98

제91항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편이 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 99

제91항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편이 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 100

제91항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편이 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 101

제92항에 있어서, 항-Her2가 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되고, 항-Her1이 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체.

청구항 102

제92항에 있어서, 항-Her2로부터 수득된 항체 단편이 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하고, 항-Her1로부터 수득된 항체 단편이 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 103

제92항에 있어서, 항-Her2로부터 수득된 항체 단편이 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고, 항-Her1로부터 수득된 항체 단편이 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 104

제92항에 있어서, 항-Her2로부터 수득된 항체 단편이 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고; 항-Her1로부터 수득된 항체 단편이 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 105

제90항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb 및 항-Fc ϵ RI a로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체.

청구항 106

제105항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제2 모 항체가 항-Fc ϵ RI a 이거나, 또는 제1 모 항체가 항-Fc ϵ RI a이고, 제2 모 항체가 항-Fc γ RIIb인 다중특이적 항체.

청구항 107

제105항에 있어서, 항-Fc γ RIIb가 5A6인 다중특이적 항체.

청구항 108

제105항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편이 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 109

제105항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편이 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 110

제105항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편이 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 111

제105항에 있어서, 항-Fc ϵ RI a가 22E7인 다중특이적 항체.

청구항 112

제105항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc ϵ RI a이고, 제1 항체 단편이 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 113

제105항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편이 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 114

제105항에 있어서, 제1 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편이 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 115

제106항에 있어서, 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 항체 단편이 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하고, 항-Fc ε RI α로부터 수득된 항체 단편이 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 116

제106항에 있어서, 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 항체 단편이 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고, 항-Fc ε RI α로부터 수득된 항체 단편이 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 117

제106항에 있어서, 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 항체 단편이 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고; 항-Fc ε RI α로부터 수득된 항체 단편이 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열 및 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 118

제90항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미도 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 퍼리딜 디술피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-나트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오술포네이트로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체.

청구항 119

제118항에 있어서, 티오-반응성 가교제가 비스-말레이미드인 다중특이적 항체.

청구항 120

제90항에 있어서, 제1 항체 단편 및/또는 제2 항체 단편이 시스테인-조작된 항체로부터 수득된 것인 다중특이적 항체.

청구항 121

제120항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 다중특이적 항체.

청구항 122

제120항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 다중특이적 항체.

청구항 123

제90항에 있어서, 제1 모 항체가 T 세포 상의 표적에 특이적으로 결합하고, 제2 모 항체가 종양 세포 상의 표적에 특이적으로 결합하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 124

제123항에 있어서, 제1 모 항체가 항-CD3이고, 제2 모 항체가 항-BLR1, 항-BR3, 항-CD19, 항-CD20, 항-CD22, 항-CD72, 항-CD79A, 항-CD79B, 항-CD180, 항-CR2, 항-FCER2, 항-FcRH1, 항-FcRH2, 항-FcRH5, 항-FCRL4, 항-Her2, 항-HLA-DOB 및 항-NAG14로부터 선택되는 것인 다중특이적 항체.

청구항 125

제124항에 있어서, 제1 모 항체가 항-CD3이고, 제2 모 항체가 항-CD19인 다중특이적 항체.

청구항 126

제124항에 있어서, 제1 모 항체가 항-CD3이고, 제2 모 항체가 항-CD20인 다중특이적 항체.

청구항 127

제124항에 있어서, 제1 모 항체가 항-CD3이고, 제2 모 항체가 항-CD22인 다중특이적 항체.

청구항 128

제124항에 있어서, 제1 모 항체가 항-CD3이고, 제2 모 항체가 항-FcRH5인 다중특이적 항체.

청구항 129

제124항에 있어서, 제1 모 항체가 항-CD3이고, 제2 모 항체가 항-Her2인 다중특이적 항체.

청구항 130

제90항에 있어서, 각각의 모 항체와 구별할 수 없는 하나 이상의 생물학적 활성을 나타내는 다중특이적 항체.

청구항 131

제90항에 있어서, 모 항체 중 적어도 하나와 구별할 수 있는 하나 이상의 생물학적 활성을 나타내는 다중특이적 항체.

청구항 132

치료 유효량의 제90항 내지 제104항 및 제118항 내지 제131항 중 어느 한 항의 다중특이적 항체를 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법.

청구항 133

(i) 유리 술프히드릴 기를 갖는 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교체와 반응시켜 항체 단편-가교체 모이어티를 생성하는 것, 및

(ii) 상기 항체 단편-가교체 모이어티를 유리 술프히드릴 기를 갖는 제2 항체 단편과 반응시켜 항체 유사체를 생성하는 것

을 포함하며, 여기서 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 단일 모 항체로부터 수득된 것인 방법에 의해 합성된 항체 유사체.

청구항 134

제133항에 있어서, 모 항체가 항-Her1, 항-Her2, 항-Fc ε RI a 및 항-Fc γ RIIb로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 135

제134항에 있어서, 항-Her2가 트拉斯투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 136

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 137

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 중쇄 서열을 포함하고,

여기서 중쇄 서열은 서열 4, 5 및 8로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 138

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Her2이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열 및 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택되고, 중쇄 서열은 서열 4, 5 및 8로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 139

제134항에 있어서, 항-Her1이 D1-5 및 C3-101로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 140

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 141

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 중쇄 서열은 서열 17 및 20으로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 142

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Her1이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열 및 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택되고, 중쇄 서열은 서열 17 및 20으로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 143

제134항에 있어서, 항-Fc γ RIIb가 5A6인 항체 유사체.

청구항 144

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 11 및 12로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 145

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 중쇄 서열은 서열 9 및 10으로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 146

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열 및 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 11 및 12로부터 선택되고, 중쇄 서열은 서열 9 및 10으로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 147

제134항에 있어서, 항-Fc ϵ RI α 가 22E7인 항체 유사체.

청구항 148

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Fc ϵ RI α 이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 15 및 16으로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 149

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Fc ϵ RI α 이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 중쇄 서열은 서열 13 및 14로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 150

제134항에 있어서, 모 항체가 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편이 동일한 경쇄 서열 및 동일한 중쇄 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 서열은 서열 15 및 16으로부터 선택되고, 중쇄 서열은 서열 13 및 14로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 151

제133항에 있어서, 티오-반응성 가교체가 비스-말레이미도 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 피리딜 디슬피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-나트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오슬포네이트로부터 선택되는 것인 항체 유사체.

청구항 152

제151항에 있어서, 티오-반응성 가교체가 비스-말레이미드인 항체 유사체.

청구항 153

제133항에 있어서, 모 항체가 시스테인-조작된 항체인 항체 유사체.

청구항 154

제153항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환이 시스테인인 항체 유사체.

청구항 155

제153항에 있어서, 시스테인-조작된 항체가 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인인 항체 유사체.

청구항 156

제133항에 있어서, 모 항체가 천연 항체이고, 여기서 천연 항체는 펩신으로 소화되어 $F(ab')_2$ 단편을 생성하고, 상기 $F(ab')_2$ 단편은 정제되고, 환원제로 처리된 후에, Fab의 중쇄와 경쇄 사이의 디슬피드가 재형성되고 헌지 영역 내 시스테인 잔기가 산화되지 않은 상태로 남아있는 조건하에 산화제로 처리되는 것인 항체 유사체.

청구항 157

제133항에 있어서, 모 항체의 항원 결합 영역과 구조적으로 상이한 항원 결합 영역을 갖는 항체 유사체.

청구항 158

제90항 또는 제133항에 있어서, 가교체가 보호된 SH 기를 포함하는 변형된 가교체인 항체.

청구항 159

제158항에 있어서, 변형된 가교체가 비스-말레이미도-아세틸아세테이트 (BMata)인 항체.

청구항 160

제158항에 있어서, 변형된 가교체를 포함하는 항체가 관능기를 포함하는 작용제와 추가로 반응하는 것인 항체.

청구항 161

제160항에 있어서, 작용제가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 알부민-결합 펩티드 (ABP), 형광 태그, 방사선영상화제, 세포독성제 및 siRNA로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 162

제161항에 있어서, 작용제가 PEG이고, 상기 PEG는 2000 mw (2K) PEG, 12,000 mw (12K) PEG 및 20,000 mw (20K) PEG로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 163

제133항에 있어서, 모 항체와 구별할 수 없는 하나 이상의 생물학적 활성을 나타내는 항체 유사체.

청구항 164

제163항에 있어서, 생물학적 활성이 세포 증식인 항체 유사체.

청구항 165

제164항에 있어서, 항체 유사체가 Her2-발현 세포의 길항제이고, 모 항체가 트拉斯투주맙인 항체 유사체.

청구항 166

제165항에 있어서, 비스-Fab 1324, 비스-Fab 1328 및 비스-Fab 1329로부터 선택된 항체 유사체.

청구항 167

제133항에 있어서, 모 항체와 구별할 수 있는 하나 이상의 생물학적 활성을 나타내는 항체 유사체.

청구항 168

제167항에 있어서, 항체 유사체의 생물학적 활성이 길항작용이고, 모 항체의 생물학적 활성이 효능작용인 항체 유사체.

청구항 169

제167항에 있어서, 항체 유사체의 생물학적 활성이 효능작용이고, 모 항체의 생물학적 활성이 길항작용인 항체 유사체.

청구항 170

제169항에 있어서, 생물학적 활성이 세포 증식인 항체 유사체.

청구항 171

제170항에 있어서, 항체 유사체가 Her2-발현 세포의 증식의 효능제이고, 모 항체가 트拉斯투주맙인 항체 유사체.

청구항 172

제171항에 있어서, 비스-Fab 1188, 비스-Fab 1321, 비스-Fab 1322, 비스-Fab 1323 및 비스-Fab 1325로부터 선택된 항체 유사체.

청구항 173

비스-Fab 1187, 비스-Fab 1189, 비스-Fab 1190, 비스-Fab 1191, 비스-Fab 1192, 비스-Fab 1193, 비스-Fab 1299, 비스-Fab 1300, 비스-Fab 1301, 비스-Fab 1302, 비스-Fab 1303, 비스-Fab 1304, 비스-Fab 1305, 비스-Fab 1306 및 비스-Fab 1307로부터 선택된 하나 이상의 다중특이적 항체를 포함하는 조성물.

청구항 174

비스-Fab 1188, 비스-Fab 1204, 비스-Fab 1321, 비스-Fab 1322, 비스-Fab 1323, 비스-Fab 1324, 비스-Fab 1325, 비스-Fab 1326, 비스-Fab 1327, 비스-Fab 1328, 비스-Fab 1329, 비스-Fab 1400 및 비스-Fab 1401로부터 선택된 하나 이상의 항체 유사체를 포함하는 조성물.

명세서**기술분야**

<관련 출원에 대한 상호 참조>

- [0002] 본 출원은 2009년 12월 4일에 출원된 미국 가출원 번호 61/267,006, 및 2010년 5월 20일에 출원된 미국 가출원 번호 61/346,566을 우선권 주장하고, 이들은 둘 다 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.
- [0003] <서열 목록>
- [0004] 본 출원은 EFS-Web을 통하여 ASCII 포맷으로 제출된, 그의 전체가 본원에 참고로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2010년 11월 30일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P4377R1WO.txt로 명명되고, 크기는 53,549 바이트이다.
- [0005] <분야>
- [0006] 적어도 2가지 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항체가 제공된다. 천연 항체 (항체 유사체)의 구조적 변이체가 또한 제공된다. 또한, 소정 범위의 생물학적 활성을 갖는 다중특이적 항체 및 항체 유사체가 제공된다. 치료제 및/또는 진단제와 접합된 다중특이적 항체 및 항체 유사체가 또한 제공되며, 이는 이러한 작용제가 결여된 다중특이적 항체 및 항체 유사체에 비해 생체내 반감기를 증가시키기 위해 작용제와 접합된 다중특이적 항체 및 항체 유사체이다. 또한, 다중특이적 항체 및 항체 유사체의 제조 방법 및 다중특이적 항체 및 항체 유사체를 포함하는 조성물이 제공된다. 다중특이적 항체 및 항체 유사체의 치료, 연구 및 진단적 용도가 또한 제공된다.

배경기술

- [0007] 모노클로날 항체는 암, 면역학적 및 신경학적 장애, 또한 감염성 질환을 포함하는 다양한 장애의 치료를 위한 새로운 치료를 제공하였다. 문헌 [Newsome, B. W. et al., Br J Clin Pharmacol 66(1):6-19 (2008)]; [Chames, P., et al., Br J Pharmacol 157(2):220-33 (2009)]; [Dimitrov, D. S. et al., Methods Mol Biol 525:1-27, xiii (2009)]. 이러한 치료는 적어도 부분적으로 표적 단백질과의 강건하고 강한 상호작용 및 모노클로날 항체를 제공하는 단일 특이성 때문에 성공적이었다. 생체내에서 모노클로날 항체의 상대적인 긴 반감기 및 안정성은 원하는 투약 처방을 허용하고, 세포-매개 세포독성은 항체의 Fc 영역과 관련될 수 있다 (문헌 [Tabrizi, M. A., et al., Drug Discov Today 11(1-2):81-8 [2006]]). 특정 예에서, 치료 항체는 분비된 및 세포-표면 단백질의 중요한 기능적 영역에 결합하여 이를 중화시킴으로써 세포 신호를 차단하는데 사용되었다. 모노클로날 항체의 이러한 기초적인 특성은 현재 전통적인 항체에 비해 상이한 작용 메카니즘을 갖는 분자 치료를 설계하는데 사용되고 있다 (문헌 [Dimitrov, D. S. et al., Methods Mol Biol 525:1-27, xiii [2009]]). 이러한 특정 기술은 현재 임상 개발 중이고, 가능한 신호가 나타났다 (문헌 [Chames, P., et al., Br J Pharmacol 157(2):220-33 [2009]]).

- [0008] 예를 들어, 한 가지 접근법은 세포독성 약물을 종양에 전달하기 위해 항체를 사용하는 세포-특이적 표적화를 포함한다. 문헌 [Carter, P. J. et al., Cancer J 14(3):154-69 (2008)]; [Junutula, J. R., et al., Nat Biotechnol 26(8):925-32 (2008)]; [Senter, P. D., Curr Opin Chem Biol 13(3):235-44 (2009)]. 이러한 경우에, 모노클로날 항체 특이성은 세포독성 분자를 표적 세포로 향하게 함으로써 비표적 세포에 대한 영향을 최소화시키면서 필요한 곳에 세포독성 모이어티의 높은 독성을 집중시킨다. 이러한 항체-약물 접합체는 표적에서 벗어난 독성을 최소화시키는 투약의 창을 유지하면서 종양 세포를 사멸시키는 효능을 증가시킨다.

- [0009] 또 다른 예는 siRNA와 같은 작용제를 함유하고, 표적화를 위해 입자의 표면 상에 모노클로날 항체를 포함하는 기능적 복합체, 예컨대 나노입자의 전달이다. 문헌 [Schiffelers, R. M., et al., Nucleic Acids Res 32(19):e149 (2004)]; [Vornlocher, H. P., Trends Mol Med 12(1):1-3 (2006)]; [Davis, M. E., Mol Pharm 6(3):659-68 (2009)].

- [0010] 또 다른 접근법은 동시에 2가지 표적에 결합하는 이중특이적 분자를 구축하기 위해 항체의 2가 구조를 사용하는 것이다 (문헌 [Fischer, N. et al., Pathobiology 74(1):3-14 [2007]]). 이중특이적 항체는 특이성을 증가시키고, 효능을 확대시키고, 전통적인 모노클로날 항체로 달성될 수 없는 신규 작용 메카니즘을 사용할 기회를 제공한다. 문헌 [Drakeman, D. L., Expert Opin Investig Drugs 6(9):1169-78 (1997)]; [Kontermann, R. E., Acta Pharmacol Sin 26(1):1-9 (2005)]; [Marvin, J. S. et al., Acta Pharmacol Sin 26(6):649-58 (2005)]; [Marvin, J. S., et al., Curr Opin Drug Discov Devel 9(2):184-93 (2006)]; [Shen, J., et al., J Biol Chem 281(16):10706-14 (2006)]; [Chames, P. et al., Curr Opin Drug Discov Devel 12(2):276-83 (2009)]. 신호전달 경로를 억제하기 위해 이중특이적 항체를 사용하여 2가지 상이한 수용체를 가교시키는 것은 다수의 적용에서 유용성을 나타내었다. 한 예에서, 세포-표면 티로신 포스파타제를 IgE 수용체 복합체로 동원하여 인산화된 IgE 수용체의 활성을 감소시켰다 (문헌 [Jackman, et al., J. Biol. Chem. 285:20850-20859 (2010)]). 이러한 접근법은 리간드 결합 부위를 차단하는 것보다 더 효과적이었는데, 이는 이중특이적 항체에 의한 신호전

달의 억제가 높은 농도의 리간드의 존재하에서도 일어나기 때문이다. 상기 문헌.

[0011] 세포독성 T-세포를 동원하기 위한 이중특이적 항체의 사용은 또한 T-세포 활성화가 2가지 상이한 세포 유형 상에서 동시에 이중특이적 항체 결합 수용체에 의해 종양 세포에 근접하여 달성되는 임상적 기회를 보여주었다. 문헌 [Bargou, R., E., et al., *Science* 321(5891):974-7 (2008)]; [Shekhar, C., *Chem Biol* 15(9): 877-8 (2008)]; [Baeuerle, P. A., et al., *Cancer Res* 69(12):4941-4 (2009)]. 한 접근법에서, 하나의 아암은 Fc γ RIII에 결합하고 또 다른 아암은 HER2 수용체에 결합한 이중특이적 항체를 HER2를 과다발현하는 난소 및 유방 종양의 치료를 위해 개발하였다. (문헌 [Hsieh-Ma et al. *Cancer Research* 52:6832-6839 [1992]] 및 [Weiner et al. *Cancer Research* 53:94-100 [1993]]). 이중특이적 항체는 또한 T 세포에 의한 사멸을 매개할 수 있다. 전형적으로, 이중특이적 항체는 CD3 복합체를 T 세포 상에서 종양-관련 항원에 연결시킨다. 항-p185^{HER2}에 연결된 항-CD3으로 이루어진 완전히 인간화된 F(ab')₂ 이중특이적 항체를 사용하여 HER2 수용체를 과다발현하는 종양 세포를 사멸시키기 위해 T 세포를 표적화하였다. 문헌 [Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175(1):217 (1992)]. 이중특이적 항체를 고무된 결과를 갖는 여러 초기 단계 임상 시험에서 시험하였다. 한 시험에서, 폐, 난소 또는 유방 암을 갖는 12명의 환자를 항-CD3/항-종양 (MOC31) 이중특이적 항체로 표적화된 활성화된 T-림프구를 주입하여 처리하였다. 문헌 [deLeij et al. *Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity*, Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds., Lienhart (1991) p. 249]. 표적화된 세포는 종양 세포의 상당한 국부 용해, 약한 염증 반응을 유도하나, 독성 부작용 또는 항-마우스 항체 반응을 유도하지 않는다.

[0012] 또한, 이중특이적 항체는 감염성 질환의 치료에서 (예를 들어, HIV 또는 인플루엔자 바이러스 또는 원생동물, 예컨대 톡소플라스마 곤디이 (*Toxoplasma gondii*)와 같은 바이러스 감염된 세포에 대해 이팩터 세포를 표적화하기 위해) 사용될 수 있거나, 면역독소를 종양 세포에 전달하기 위해 사용될 수 있거나, 또는 세포 표면 수용체에 면역 복합체를 표적화할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Fanger et al., *Crit. Rev. Immunol.* 12:101-124 (1992)]을 참조한다. 예를 들어, HIV 감염과 관련하여, 문헌 [Berg et al., *PNAS (USA)* 88:4723-4727 (1991)]에서는 뮤린 CD4-IgG로부터 유래된 이중특이적 항체-이뮤노어드헤신 키메라를 제조하였다. 이들 작업자는 2개의 아암을 갖는 사랑체 분자를 구축하였다. 하나의 아암은 항체 경쇄 불변 도메인과의 CD4 융합체와 함께 항체 경쇄 불변 도메인과 융합된 CD4로 구성된다. 다른 아암은 동일한 항체의 완전한 경쇄와 함께 항-CD3 항체의 완전한 경쇄로 구성된다. CD4-IgG 아암에 의해, 이 이중특이적 분자는 세포독성 T 세포의 표면 상에서 CD3에 결합한다. 세포독성 세포 및 HIV-감염된 세포의 병치는 후자의 세포를 특이적으로 사멸시킨다.

[0013] 이중특이적 항체를 포함한 다중특이적 항체의 합성을 위한 다수의 방법이 기재되어 있다. 2가 항체 단편의 합성을 위한 방법은 WO 99/64460에 기재되어 있다. 그러나, 이들 접근법 중 다수에는 다양한 문제점에 존재한다. 예를 들어, 단백질 발현 및 대규모 생산, 안정성 및 생체내 반감기, 풀딩 및 응집에서의 어려움이 모두 보고되었다. 문헌 [Morimoto, K., et al., *J Immunol Methods* 224(1-2):43-50 (1999)]; [Kriangkum, J., et al., *Biomol Eng* 18(2):31-40 (2001)]; [Segal, D. M. and B. J. Bast (2001). "Production of bispecific antibodies." *Curr Protoc Immunol Chapter 2:Unit 2 13*]; [Graziano, R. F., et al., *Methods Mol Biol* 283:71-85 (2004)]; [Kontermann, R. E., et al., *Methods Mol Biol* 248:227-42 (2004)]; [Das, D., et al., *Methods Mol Med* 109:329-46 (2005)]; [Fischer, N. et al., *Pathobiology* 74(1):3-14 (2007)]; [Shen, J., et al., *J Immunol Methods* 318(1-2):65-74 (2007)]. 또한, 이들 방법 중 다수는 번거롭고 시간 소요적이며, 이에 따라 원하는 활성에 대해 구축 및 스크리닝할 수 있는 분자의 수 및 다양성이 제한된다. 본원에 기재된 방법이 이러한 문제를 다루고 있고, 본원에 기재된 방법, 조성물, 다중특이적 항체 및 항체 유사체는 추가의 이점을 제공한다.

[0014] 특히 출원 및 공보를 비롯한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 임의의 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0015] <개요>

[0016] 본 발명의 방법 및 조성물은 적어도 부분적으로 고순도 다중특이적 항체 및 항체 유사체의 신뢰할 만하고 재현 가능한 생성을 위한 과정의 개발에 기초한다. 특정 실시양태에서, 다수의 다중특이적 또는 단일특이적 조합은 용이하게 제조되고, 원하는 활성에 대해 스크리닝될 수 있다. 한 측면에서, 새로운 항체 기능 조작 방법은 천연 항체의 구조적 변이체가 강한 길항체로부터 강한 효능체까지 이들 사이에 변화하는 수준의 활성을 갖는 광범위한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 놀랍고 예상하지 못한 발견에 기초하여 제공된다. 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 방법을 이용하여, 기존의 모 항체와 관련되지 않은 새로운 기능을 보유하는, 기존의 모 항체로부터

터 수득된 다중특이적 항체 및 항체 유사체가 제공된다. 본원에 기재된 방법 및 다중특이적 항체 및 항체 유사체는 적어도 부분적으로 새로운 치료제 및 진단제 및 연구 도구의 생성, 스크리닝, 확인 및 개발을 위한 신규 접근법을 제공한다.

[0017]

한 측면에서, 제1 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제1 모 항체로부터 수득된 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하고, 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 제2 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제2 모 항체로부터 수득된 제2 항체 단편과 반응시켜 다중특이적 항체를 생성하며, 여기서 제1 단일특이성은 제2 단일특이성과 상이한 것인, 다중특이적 항체의 합성 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her1 및 항-Her2로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her2이고, 제2 모 항체는 항-Her1이거나, 또는 제1 모 항체는 항-Her1이고, 제2 모 항체는 항-Her2이다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 헤르셉틴(Herceptin)® (트라스투주맙) 및 2C4 (페르투주맙)로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her2이고, 제1 항체 단편은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her1이고, 제1 항체 단편은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되고, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her2로부터 수득된 항체 단편은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고, 항-Her1로부터 수득된 항체 단편은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다.

[0018]

상기 기재된 방법의 추가의 측면에서, 제1 모 항체는 항-Fc γ RIIb 및 항-Fc ε RI α로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Fc γ RIIb이고, 제2 모 항체는 항-Fc ε RI α이거나, 또는 제1 모 항체는 항-Fc ε RI α이고, 제2 모 항체는 항-Fc γ RIIb이다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIIb는 5A6이다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편은 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Fc ε RI α는 22E7이다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편은 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 항체 단편은 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고; 항-Fc ε RI α로부터 수득된 항체 단편은 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다.

[0019]

또 다른 측면에서, 티오-반응성 가교제는 비스-말레이미도 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 퍼리딜 디술피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-니트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오술포네이트로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 가교제는 비스-말레이미드이다. 특정 실시양태에서, 제1 항체 단편 및/또는 제2 항체 단편은 시스테인-조작된 항체로부터 수득한다. 이러한 특정 실시양태에서, 제1 항체 단편 및/또는 제2 항체 단편은 티오-Fab이다. 특정 실시양태에서, 시스테인-조작된 항체는 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 시스테인 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따른다. 특정 실시양태에서, 시스테인-조작된 항체는 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 시스테인 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따른다. 특정 실시양태에서, 제1 항체 단편 및/또는 제2 항체 단편은 천연 항체로부터 수득된 것이고, 여기서 천연 항체는 팝신으로 소화되어 $F(ab')_2$ 단편을 생성하고, 상기 $F(ab')_2$ 단편은 정제되고, 환원제로 처리된 후에, Fab의 중쇄와 경쇄 사이의 디술피드가 재형성되고 힌지 영역 내 시스테인 잔기가 산화되지 않은 상태로 남아있는 조건하에 산화제로 처리된다.

[0020]

또 다른 측면에서, 유리 술프히드릴 기를 갖는 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하고, 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 유리 술프히드릴 기를 갖는 제2 항체 단편과 반응시켜 항체 유사체를 생성하며, 여기서 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 단일 모 항체로부터 수득된 것인, 항체 유사체의 합성 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 항체 유사체는 모 항체의 항원 결합 영역과 구조적으로 상이한 항원 결합 영역을 갖는다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Her1, 항-Her2, 항-Fc ε RI α 및 항-Fc γ RIIb로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 헤르셉틴® (트라스투주맙) 및 2C4 (페르투주맙)로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Her2이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 동일한 경쇄 서열 (여기서, 경쇄 서열은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택됨) 및/또는 동일한 중쇄 서열 (여기서, 중쇄 서열은 서열 4, 5 및 8로부터 선택됨)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다.

특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Her1이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 동일한 경쇄 서열 (여기서, 경쇄 서열은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택됨) 및/또는 동일한 중쇄 서열 (여기서, 중쇄 서열은 서열 17 및 20으로부터 선택됨)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIIb는 5A6이다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 동일한 경쇄 서열 (여기서, 경쇄 서열은 서열 11 및 12로부터 선택됨) 및/또는 동일한 중쇄 서열 (여기서, 중쇄 서열은 서열 9 및 10으로부터 선택됨)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Fc ϵ RI α 는 22E7이다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Fc ϵ RI α 이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 동일한 경쇄 서열 (여기서, 경쇄 서열은 서열 15 및 16으로부터 선택됨) 및/또는 동일한 중쇄 서열 (여기서, 중쇄 서열은 서열 13 및 14로부터 선택됨)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 시스테인-조작된 항체이다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 천연 항체이다.

[0021] 추가의 측면에서, 상기와 같은 다중특이적 항체 또는 항체 유사체의 합성 방법이 제공되고, 여기서 가교체는 보호된 SH 기를 포함하는 변형된 가교체이다. 한 실시양태에서, 변형된 가교체는 비스-말레이미도-아세틸아세테이트 (BMata)이다. 특정 실시양태에서, 변형된 가교체를 포함하는 다중특이적 항체 또는 항체 유사체는 관능기를 포함하는 작용제와 추가로 반응시킨다. 특정 실시양태에서, 작용제는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 알부민-결합 팹티드 (ABP), 형광 태그, 방사선영상화제, 세포독성제 및 siRNA로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 변형된 가교체를 포함하는 다중특이적 항체 또는 항체 유사체는 PEG와 추가로 반응시킨다. 특정 실시양태에서, PEG는 2000 mw (2K) PEG, 12,000 mw (12K) PEG 또는 20,000 mw (20K) PEG이다.

[0022] 또 다른 측면에서, 제1 단일특이성 및 유리 슬프히드릴 기를 갖는 제1 모 항체로부터 수득된 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하고, 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 제1 모 항체의 상이한 단일특이성의 하나 이상의 모 항체로부터 수득된, 각각 유리 슬프히드릴 기를 갖는 2개 이상의 추가의 항체 단편과 각각 쌍으로 반응시켜 다중특이적 항체의 패널을 생성하는, 다중특이적 항체의 패널의 합성 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 항체 단편-가교제 모이어티는 각각의 3개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 4개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 5개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 10개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 15개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 20개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 25개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 50개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 100개 이상의 추가의 항체 단편과 쌍으로 반응시키고, 이들 항체 단편은 각각의 경우에 1개 이상의 모 항체, 또는 2개 이상의 모 항체, 또는 3개 이상의 모 항체, 또는 4개 이상의 모 항체, 또는 5개 이상의 모 항체, 또는 10개 이상의 모 항체, 또는 15개 이상의 모 항체, 또는 20개 이상의 모 항체, 또는 25개 이상의 모 항체, 또는 50개 이상의 모 항체, 또는 100개 이상의 모 항체로부터 수득된 것이고, 이들 모 항체는 각각의 경우에 제1 모 항체와 상이한 단일특이성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her1, 항-Her2, 항-Fc ϵ RI α 및 항-Fc γ RIIb로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 항체 단편은 항-Her2로부터 수득되고, 2개 이상의 추가의 항체 단편은 각각 항-Her1로부터 수득하거나, 또는 제1 항체 단편은 항-Her1로부터 수득되고, 2개 이상의 추가의 항체 단편은 각각 항-Her2로부터 수득하거나, 또는 제1 항체 단편은 항-Fc ϵ RI α 로부터 수득되고, 2개 이상의 추가의 항체 단편은 각각 항-Fc γ RIIb로부터 수득하거나, 또는 제1 항체 단편은 항-Fc γ RIIb로부터 수득되고, 2개 이상의 추가의 항체 단편은 각각 항-Fc ϵ RI α 로부터 수득한다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 헤르셉틴® (트라스투주맙) 및 2C4 (페르투주맙)로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되고, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIIb는 5A6이다. 특정 실시양태에서, 항-Fc ϵ RI α 는 22E7이다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIIb는 5A6이고, 항-Fc ϵ RI α 는 22E7이다. 특정 실시양태에서, 티오-반응성 가교체는 비스-말레이미도 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 피리딜 디솔피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-니트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오솔포네이트로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 티오-반응성 가교체는 비스-말레이미드이다. 특정 실시양태에서, 제1 항체 단편 및/또는 2개 이상의 추가의 항체 단편은 각각 시스테인-조작된 항체로부터 수득한다. 이러한 특정 실시양태에서, 시스테인-조작된 항체는 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인이다. 특정 실시양태에서, 시스테인-조작된 항체는 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인이다.

[0023] 또 다른 측면에서, 유리 슬프히드릴 기를 갖는 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성하고, 상기 항체 단편-가교제 모이어티를 각각 유리 슬프히드릴 기를 갖는 2개의 이상의 추가의 항체 단편과 각각 쌍으로 반응시켜 항체 유사체의 패널을 생성하며, 여기서 각각의 항체 단편은 단일 모 항체로부터 수득된 것인 항체 유사체의 패널의 합성 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 항체 단편-가교제

모이어티를 각각의 3개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 4개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 5개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 10개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 15개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 20개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 25개 이상의 추가의 항체 단편, 또는 각각의 50개 이상의 추가의 항체 단편과 쌍으로 반응시키고, 여기서 각각의 항체 단편은 단일 모 항체로부터 수득한다. 특정 실시양태에서, 패널의 하나 이상의 항체 유사체는 모 항체의 항원 결합 영역과 구조적으로 상이한 항원 결합 영역을 갖는다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Her1, 항-Her2, 항-Fc ε RI α 및 항-Fc γ RIIb로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIIb는 5A6이다. 특정 실시양태에서, 항-Fc ε RI α는 22E7이다. 특정 실시양태에서, 티오-반응성 가교체는 비스-말레이미드 할라이드, 비스-알킬 할라이드, 피리딜 디슬피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-니트로벤조산-매개 가교 및 비스-티오술포네이트로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 티오-반응성 가교체는 비스-말레이미드이다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 시스테인-조작된 항체이다. 이러한 특정 실시양태에서, 시스테인-조작된 항체는 경쇄의 위치 110 또는 위치 205에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인이다. 특정 실시양태에서, 시스테인-조작된 항체는 중쇄의 위치 118 또는 위치 121에서 치환을 포함하고, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따르고, 치환은 시스테인이다.

[0024]

추가의 측면에서, 제1 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제1 모 항체로부터 수득된 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교체와 반응시켜 항체 단편-가교체 모이어티를 생성한 후에, 이 항체 단편-가교체 모이어티를 제2 단일특이성 및 유리 술프히드릴 기를 갖는 제2 모 항체로부터 수득된 제2 항체 단편과 반응시켜 다중특이적 항체를 생성하며, 여기서 제1 단일특이성은 제2 단일특이성과 상이한 것인 방법에 의해 합성된 다중특이적 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her1 및 항-Her2로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her2이고, 제2 모 항체는 항-Her1이거나, 또는 제1 모 항체는 항-Her1이고, 제2 모 항체는 항-Her2이다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 헤르셉틴® (트라스투주맙) 및 2C4 (페르투주맙)로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her2이고, 제1 항체 단편은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Her1이고, 제1 항체 단편은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 트라스투주맙 및 페르투주맙으로부터 선택되고, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her2로부터 수득된 항체 단편은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 4, 5 및 8로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고; 항-Her1로부터 수득된 항체 단편은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 17 및 20으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다.

[0025]

상기 기재된 다중특이적 항체의 추가의 측면에서, 제1 모 항체는 항-Fc γ RIIb 및 항-Fc ε RI α로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Fc γ RIIb이고, 제2 모 항체는 항-Fc ε RI α이거나, 또는 제1 모 항체는 항-Fc ε RI α이고, 제2 모 항체는 항-Fc γ RIIb이다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIIb는 5A6이다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Fc γ RIIb이고, 제1 항체 단편은 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Fc ε RI α는 22E7이다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-Fc ε RI α이고, 제1 항체 단편은 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIIb로부터 수득된 항체 단편은 서열 11 및 12로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 9 및 10으로부터 선택된 중쇄 서열을 포함하고; 항-Fc ε RI α로부터 수득된 항체 단편은 서열 15 및 16으로부터 선택된 경쇄 서열 및/또는 서열 13 및 14로부터 선택된 중쇄 서열을 포함한다.

[0026]

다른 추가의 측면에서, 상기 기재된 바와 같은 과정에 의해 합성된 다중특이적 항체가 제공되고, 여기서 제1 모 항체는 T 세포 상의 표적에 특이적으로 결합하고, 제2 모 항체는 종양 세포 상의 표적에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-CD3이고, 제2 모 항체는 항-BLR1, 항-BR3, 항-CD19, 항-CD20, 항-CD22, 항-CD72, 항-CD79A, 항-CD79B, 항-CD180, 항-CR2, 항-FCER2, 항-FcRH1, 항-FcRH2, 항-FcRH5, 항-FCRL4, 항-Her2, 항-HLA-DOB 및 항-NAG14로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-CD3이고, 제2 모 항체는 항-CD19이다. 한 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-CD3이고, 제2 모 항체는 항-CD20이다. 한 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-CD3이고, 제2 모 항체는 항-CD22이다. 한 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-CD3이고, 제2 모 항체는 항-FcRH5이다. 한 실시양태에서, 제1 모 항체는 항-CD3이고, 제2 모 항체는 항-Her2이다. 특정 실시양태에서, 다중특이적 항체는 폴리에피토프 특이성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 다중특이적 항체는 각각의 모

항체와 구별할 수 없는 하나 이상의 생물학적 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 다중특이적 항체는 모 항체 중 적어도 하나와 구별할 수 있는 하나 이상의 생물학적 활성을 나타낸다.

[0027] 또 다른 측면에서, 유리 슬프히드릴 기를 갖는 제1 항체 단편을 티오-반응성 가교제와 반응시켜 항체 단편-가교제 모이어티를 생성한 후에, 이 항체 단편-가교제 모이어티를 유리 슬프히드릴 기를 갖는 제2 항체 단편과 반응시켜 항체 유사체를 생성하며, 여기서 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 단일 모 항체로부터 수득된 것인 방법에 의해 합성된 항체 유사체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Her1, 항-Her2, 항-Fc ε RI a 및 항-Fc γ RIb로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 헤르셉틴® (트라스투주맙) 및 2C4 (페르투주맙)로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Her2이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 동일한 경쇄 서열 (여기서, 경쇄 서열은 서열 1, 2, 3, 6 및 7로부터 선택됨) 및/또는 동일한 중쇄 서열 (여기서, 중쇄 서열은 서열 4, 5 및 8로부터 선택됨)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Her1이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 동일한 경쇄 서열 (여기서, 경쇄 서열은 서열 18, 19, 21 및 22로부터 선택됨) 및/또는 동일한 중쇄 서열 (여기서, 중쇄 서열은 서열 17 및 20으로부터 선택됨)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Fc γ RIb는 5A6이다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Fc γ RIb이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 동일한 경쇄 서열 (여기서, 경쇄 서열은 서열 11 및 12로부터 선택됨) 및/또는 동일한 중쇄 서열 (여기서, 중쇄 서열은 서열 9 및 10으로부터 선택됨)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Fc ε RI a는 22E7이다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 항-Fc ε RI a이고, 제1 항체 단편 및 제2 항체 단편은 동일한 경쇄 서열 (여기서, 경쇄 서열은 서열 15 및 16으로부터 선택됨) 및/또는 동일한 중쇄 서열 (여기서, 중쇄 서열은 서열 13 및 14로부터 선택됨)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 시스테인-조작된 항체이다. 특정 실시양태에서, 모 항체는 천연 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체 유사체는 모 항체와 구별할 수 없는 하나 이상의 생물학적 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 항체 유사체는 모 항체와 구별할 수 있는 하나 이상의 생물학적 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 생물학적 활성은 세포증식이다. 특정 실시양태에서, 항체 유사체는 Her2-발현 세포의 길항제이고, 모 항체는 헤르셉틴® (트라스투주맙)이다. 이러한 특정 실시양태에서, 항체 유사체는 비스-Fab 1324, 비스-Fab 1328 및 비스-Fab 1329로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항체 유사체의 생물학적 활성은 길항작용이고, 모 항체의 생물학적 활성은 효능작용이다. 특정 실시양태에서, 항체 유사체의 생물학적 활성은 효능작용이고, 모 항체의 생물학적 활성은 길항작용이다. 특정 실시양태에서, 항체 유사체는 Her2-발현 세포의 효능제이고, 모 항체는 헤르셉틴® (트라스투주맙)이다. 이러한 특정 실시양태에서, 항체 유사체는 비스-Fab 1188, 비스-Fab 1321, 비스-Fab 1322, 비스-Fab 1323 및 비스-Fab 1325로부터 선택된다.

[0028] 또 다른 측면에서, 하나 이상의 다중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 다중특이적 항체는 비스-Fab 1187, 비스-Fab 1189, 비스-Fab 1190, 비스-Fab 1191, 비스-Fab 1192, 비스-Fab 1193, 비스-Fab 1299, 비스-Fab 1300, 비스-Fab 1301, 비스-Fab 1302, 비스-Fab 1303, 비스-Fab 1304, 비스-Fab 1305, 비스-Fab 1306 및 비스-Fab 1307로부터 선택된다.

[0029] 또 다른 측면에서, 하나 이상의 항체 유사체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 항체 유사체는 비스-Fab 1188, 비스-Fab 1204, 비스-Fab 1321, 비스-Fab 1322, 비스-Fab 1323, 비스-Fab 1324, 비스-Fab 1325, 비스-Fab 1326, 비스-Fab 1327, 비스-Fab 1328, 비스-Fab 1329, 비스-Fab 1400 및 비스-Fab 1401로부터 선택된다.

[0030] 또 다른 측면에서, 치료 유효량의 상기 기재된 바와 같은 다중특이적 항체를 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 제1 항체 단편은 항-Her2이고, 제2 항체 단편은 항-Her1이다. 특정 실시양태에서, 항-Her2는 헤르셉틴® (트라스투주맙)로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-Her1은 D1-5 및 C3-101로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 항체 단편은 항-CD3이고, 제2 항체 단편은 항-BLR1, 항-BR3, 항-CD19, 항-CD20, 항-CD22, 항-CD72, 항-CD79A, 항-CD79B, 항-CD180, 항-CR2, 항-FCER2, 항-FcRH1, 항-FcRH2, 항-FcRH5, 항-FCRL4, 항-Her2, 항-HLA-DOB 및 항-NAG14로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 제1 항체 단편은 항-CD3이고, 제2 항체 단편은 항-CD19이다. 한 실시양태에서, 제1 항체 단편은 항-CD3이고, 제2 항체 단편은 항-CD20이다. 한 실시양태에서, 제1 항체 단편은 항-CD3이고, 제2 항체 단편은 항-CD22이다. 한 실시양태에서, 제1 항체 단편은 항-CD3이고, 제2 항체 단편은 항-FcRH5이다. 한 실시양태에서, 제1 항체 단편은 항-CD3이고, 제2 항체 단편은 항-Her2이다.

[0031] 또 다른 측면에서, 종양 세포 또는 암 세포의 증식을 사멸시키거나 억제하는데 효과적인 양의 상기 기재된 바와

같은 다중특이적 항체 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물로 종양 세포 또는 암 세포를 치료하는 것을 포함하는, 종양 세포 또는 암 세포의 증식을 사멸시키거나 억제하는 방법이 제공된다.

[0032] 자가면역 질환 또는 감염성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 다중특이적 항체, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질환 또는 감염성 질환의 치료 방법을 포함하는 다른 추가의 측면이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 실시예 1에 기재된 바와 같은 비스-Fab의 합성을 위한 과정을 보여준다. 패널 1, 환원 및 산화에 의한 티오-부가물의 제거; 패널 2, 제1 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab과 비스-말레이미도 가교체의 반응; 패널 3, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의한 가교체를 함유하는 단량체 종의 단리, 패널 삽입물; 패널 4, 단량체 가교된 종과 제2 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab의 반응, 100 kD 비스-Fab 생성물의 질량 분광분석법 결과 및 단리를 보여주는 상부 패널 삽입물, SEC에 의한 이량체 비스-Fab의 단리를 보여주는 하부 패널 삽입물; 패널 5, 최종 비스-Fab 생성물, 비환원 및 환원 (+DTT) 조건하의 2가지 상이한 비스-Fab, α VEGF/ α Her2 (1) 및 α VEGF/ α VEGF (2)의 SDS-PAGE 분석을 보여주는 개략적인 도면.

도 2는 실시예 2에 기재된 바와 같은 특정 비스-Fab의 순도 및 특정 생물학적 특성을 보여준다. (a) 좌측, 특정 비스-Fab의 개략도 및 비스-Fab 식별 번호 및 각각의 티오-Fab의 공급원을 제공하는 표; 우측, 표에 열거된 비스-Fab의 비-환원 SDS-PAGE 분석; (b) 상부 패널, 항-EGFR 항체로부터 유래된 Fab을 함유하는 특정 비스-Fab에 의한 NR-gD-EGFR 세포에서의 TGF α -자극된 EGFR 인산화의 억제; 하부 패널, 항-Her2 항체로부터 유래된 Fab을 함유하는 특정 비스-Fab에 의한 MCF7 세포에서의 헤레글린-유도된 Her3 인산화의 억제; (c) MDA-175 세포의 성장에 대한 지시된 비스-Fab 및 Fab 분자의 비교; (d) NR6-EGFR 세포의 성장에 대한 지시된 비스-Fab, Fab 및 항체 분자의 비교; (e) MDA-175 세포의 성장에 대한 페르투주맙 및 비스-Fab 1204의 비교; (f) BT474 세포의 성장에 대한 트라스투주맙, 트라스투주맙-Fab 및 비스-Fab 1188의 비교.

도 3은 실시예 3에 기재된 바와 같은 트라스투주맙-유래의 비스-Fab 구조적 변이체의 생성 및 특성화를 보여준다. (a) 티오-부착점을 보여주는 4가지 트라스투주맙-유래의 Fab의 개략적 표현 (상부) 및 각각의 비스-Fab에 대한 특징적인 식별자 및 각각의 티오-Fab의 공급원을 나타낸 표 (하부); (b) 비스-Fab의 비-환원 SDS-PAGE; (c) BT474 세포 성장에 대한 변화하는 농도의 비스-Fab의 효과; (d) 시간에 따라 모 항체 헤르셉틴® (트라스투주맙) (개방 막대)과 비교한 BT474 세포 성장에 대한 비스-Fab 1325 (위로 경사진 줄무늬 막대)의 효과. 아래로 경사진 줄무늬 막대, 처리하지 않음.

도 4는 실시예 3에 기재된 바와 같은 지시된 비스-Fab의 겔-여과 분석을 보여준다. 상대적 체류 시간 (수평축) (RT) 및 유체역학 반경 (Rh)을 나타낸다.

도 5는 실시예 3에 기재된 바와 같은 BT474 세포에서의 Her2 비스-Fab 및 헤르셉틴® (트라스투주맙)에 대한 신호전달 경로의 분석 결과를 보여준다. (a) 헤르셉틴® (트라스투주맙), 효능체 비스-Fab 1325, 길항체 비스-Fab 1329, 또는 gD로의 처리에 반응한 AKT 인산화의 ELISA 분석; (b) 헤르셉틴® (트라스투주맙), 효능체 비스-Fab 1325, 길항체 비스-Fab 1329 또는 gD (pHER3, pAKT, pMAPK: 포스포-특이적 항체; HER3, AKT, MAPK: 비-포스포-특이적 항체; 튜불린: 대조군)로 처리된 BT474 세포에서의 특정 Her 신호전달 경로 효소 (HER3, AKT 및 MAPK)의 인산화 상태를 프로빙하는 웨스턴 블로트 분석; (c) Her2의 트립신 절단으로부터 유래된 인산화된 웨프티드의 표. 각각의 웨프티드에서 관심있는 인산화된 잔기는 웨프티드 서열에서 진한 이탈릭체 유형의 작은 대문자로 표시된다. 표는 또한 절대적 정량 (AQUA) 또는 표지-비함유 정량에 의해 정량된, 비처리 (기초), 헤르셉틴® (트라스투주맙)으로의 처리, 효능체 비스-Fab 1325로의 처리 (비스-Fab), 또는 10 nM 헤레글린으로의 처리 후에 Her2에서의 포스포웨프티드 부위의 총 인산화의 질량 분광분석법 분석을 제공한다. 데이터는 3가지 독립적인 생물학적 및 기술적인 반복의 평균을 나타내고, 표준 편차 (SD)를 포함한다; (d) AQUA에 사용된 중원자를 함유하는 합성 웨프티드 (AQUA 웨프티드)를 열거한 표; "+13C": AQUA 웨프티드에서 탄소 중원자의 수; "+15N": AQUA 웨프티드에서 질소 중원자의 수; "부가 질량": 천연 웨프티드의 질량에 비한 AQUA 웨프티드의 총 질량 증가; "총 단일동위원소 MH⁺": 단일 대전된 상태의 총 웨프티드의 총 질량; 중원자를 함유하는 AQUA 웨프티드 내의 잔기는 진한 이탈릭체의 밑줄 표시한 큰 대문자로 표시된다; AQUA 웨프티드 내의 인산화 부위는 진한 이탈릭체의 작은 대문자로 표시된다; (e) 각각 처리하지 않은 것과 쌍으로 비교한 3가지 처리군 비스-Fab 1325 (BF 효능체, 상부 그래프), 트라스투주맙 (Herc, 중간 그래프) 및 헤레글린 (Hrg, 하부 그래프)의 비교. 인산화 부위는 하부 그래프의 수평축

을 따라 표시되고, 평균 인산화 %의 차이는 각각의 그래프의 수직축을 따라 표시된다.

도 6a 및 6b는 실시예 4에 기재된 바와 같은 ELISA에 의해 측정시 Fc ε RI a 및 Fc γ RIIb를 둘 다 발현하는 RBL 세포로부터의 히스타민 방출에 대한 증가하는 농도의 지시된 비스-Fab의 효과를 보여준다.

도 7은 실시예 5에서 기재된 바와 같은 변형된 가교체, BMata의 합성 (a) 및 peg화된 비스-Fab의 합성을 위한 일반적 반응식 (b)을 보여준다.

도 8은 실시예 5에서 기재된 바와 같은 변화하는 크기의 PEG 또는 ABP를 함유하도록 변형된 비스-Fab C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}의 SDS-PAGE 분석 (a) 및 S-200 겔 여과 분석 (b)을 보여준다.

도 9는 실시예 5에서 기재된 바와 같은 마우스 (a) 또는 누드 래트 (b)에의 투여후, 변형되지 않거나 (네이키드) 또는 변화하는 크기의 PEG 또는 ABP를 함유하도록 변형된 비스-Fab C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}의 약동학 분석을 보여준다.

도 10은 실시예 5에서 기재된 바와 같은 정제된 20K PEG-비스-Fab 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}의 SDS-PAGE 분석 (a) 및 Calu3 세포를 사용한 세포 성장 억제 검정 (b)을 보여준다.

도 11은 실시예 5에 기재된 바와 같은 SCID 베이지 마우스에서의 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab (디티오 Fab)의 약동학 실험을 보여준다. (a) 혈청 농도 대 시간의 플롯; (b) 혈청 농도/용량 대 시간의 플롯.

도 12는 실시예 5에 기재된 바와 같은 Calu3 이종이식편 마우스 모델에서의 종양 세포 성장에 대한 20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab 및 각각의 모 항체, 2C4 및 D1-5의 효과를 보여준다.

도 13은 실시예 5에 기재된 바와 같은, 종양이 2배 크기 (2xVo)가 되는데 소요되는 시간으로 분석된, Calu3 이종이식편 마우스 모델에서의 종양 세포 성장에 대한 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab 및 각각의 모 항체, 2C4 및 D1-5의 효과를 보여준다. (a) 카풀란-마이어 분석; (b) 일방향 분석.

도 14는 실시예 5에 기재된 바와 같은, 종양이 1500 mm³의 부피에 도달하는데 소요되는 시간으로 분석된, Calu3 이종이식편 마우스 모델에서의 종양 세포 성장에 대한 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab 및 각각의 모 항체, 2C4 및 D1-5의 효과를 보여준다. (a) 카풀란-마이어 분석; (b) 일방향 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

<특정 실시양태의 상세한 설명>

[0035]

이하, 본 발명의 특정 실시양태를 상세하게 언급할 것이고, 그의 예를 첨부하는 구조식 및 화학식으로 예시한다. 본 발명이 열거된 실시양태와 관련하여 기재되지만, 본 발명을 이러한 실시양태로 제한하려는 의도가 아님을 이해할 것이다. 반대로, 본 발명은 청구항에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0036]

당업자는 본 발명의 실시에 사용될 수 있는, 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 여러 방법 및 재료를 인식 할 것이다. 본 발명은 어떠한 방식으로도 본원에 기재된 방법 및 재료로 제한되지 않는다.

[0037]

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 전문 학술 용어는 본 발명이 속한 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994)]; [March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)]; 및 [Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York]은 당업자에게 본 출원에 사용된 수많은 용어에 대한 일반적인 지침을 제공한다.

[0038]

<특정 정의>

[0039]

본 명세서를 이해하기 위한 목적으로, 하기 정의가 적용될 것이고 적용할 경우에는 언제라도 단수형으로 사용된 용어는 또한 복수형도 포함할 것이고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 하기 기재된 임의의 정의가 본원에서 참고문헌으로 포함된 임의의 문헌과 모순되는 경우에는 하기 기재된 정의가 우선한다.

- [0040] 본원에서 상표명이 사용되는 경우, 본 출원인은 상표명의 시판 제제, 일반적 약물 및 상표명 제품의 활성 제약 성분(들)을 독립적으로 포함하고자 한다.
- [0041] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 임의의 이뮤노글로불린 (Ig) 분자, 및 원하는 생물학적 활성 (예를 들어, 에피토프 결합 활성)을 나타내는 한 그의 임의의 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체화를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Miller et al. Jour. of Immunology 170:4854-4861 (2003)]을 참조한다. 항체의 예는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체, 항체 유사체 및 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 항체는 뮤린, 인간, 인간화, 키메라, 또는 다른 종으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0042] 본원에서 항체 잔기는 카바트 넘버링 시스템 및 EU 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다. 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)을 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 지수"는 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 지칭할 때 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 보고된 EU 지수). "카바트에서와 같은 EU 지수"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 나타낸다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다.
- [0043] 용어 "다중특이적 항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고, 특히 폴리에피토프 특이성을 갖는 항체를 포함한다. 다중특이적 항체는 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하는 항체 (여기서, V_HV_L 단위는 폴리에피토프 특이성을 가짐), 2개 이상의 V_L 및 V_H 도메인을 갖는 항체 (여기서, 각각의 V_HV_L 단위는 상이한 에피토프에 결합함), 2개 이상의 단일 가변 도메인을 갖는 항체 (각각의 단일 가변 도메인은 상이한 에피토프에 결합함), 전장 항체, 및 하나 이상의 항체 단편을 포함하는 항체 뿐만 아니라 공유 또는 비공유 결합에 의해 연결된 항체 단편을 포함하는 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에 따라, 다중특이적 항체는 각각의 에피토프에 5 μM 내지 0.001 pM, 3 μM 내지 0.001 pM, 1 μM 내지 0.001 pM, 0.5 μM 내지 0.001 pM, 또는 0.1 μM 내지 0.001 pM의 친화도로 결합하는 IgG 항체이다.
- [0044] "폴리에피토프 특이성"은 다중특이적 항체가 동일한 표적 또는 상이한 표적(들) 상의 2가지 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 나타낸다.
- [0045] 용어 "단일특이적"과 "단일특이성"은 단지 하나의 에피토프에 결합하는 항체의 능력을 나타내고, 특히 표적 분자에 특이적으로 결합하는 분자를 포함한다.
- [0046] 용어 "항체 유사체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고, 특히 표적 분자에 단일특이성으로 특이적으로 결합하고 천연 항체와 구조적으로 상이한 분자를 포함한다. 항체 유도체는 천연 항체로부터의 하나 이상의 항체 단편을 포함할 수 있다. 항체 유사체는 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하는 항체 유사체 (여기서, V_HV_L 단위는 단일특이적임), 2개 이상의 V_L 및 V_H 도메인을 갖는 항체 유사체 (여기서, 각각의 V_HV_L 단위는 동일한 에피토프에 단일특이적임), 2개 이상의 단일 가변 도메인을 갖는 항체 유사체 (각각의 단일 가변 도메인은 동일한 에피토프에 결합함), 하나 이상의 항체 단편을 포함하는 항체 유사체, 공유 또는 비공유 결합에 의해 연결된 항체 단편을 포함하는 항체 유사체, 및 V_HV_L 단위, 단일 가변 도메인 및/또는 항체 단편이 천연 항체와 상이한 형태로 존재하는 항체 유사체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0047] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 전형적으로 무손상 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디아바디 (Db); 텐덤 디아바디 (taDb), 선형 항체 (미국 특허 번호 5,641,870, 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)] 참조); 1-아암 항체, 단일 가변 도메인 항체, 미니바디 (문헌 [Olafsen et al. (2004) Protein Eng. Design & Sel. 17(4):315-323]), 단일-쇄 항체 분자, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타임 (항-Id) 항체, CDR (상보성 결정 영역), 및 에피토프-결합 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 용어 "Fab"는 H 쇄의 가변 영역 도메인 (V_H), 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1)과 함께 전체 L 쇄 (V_L 및 C_L)로 이루어진 항체 단편을 나타낸다. 무손상 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원 결합 부위를 함유하는

2개의 Fab 단편을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 전형적으로, 파파인 소화에 의해 생성된 Fab의 L 쇄 및 H 쇄 단편은 쇄간 디슬피드 결합에 의해 연결된다.

[0049] 용어 "Fc"는 디슬피드 결합에 의해 함께 연결된 두 H 쇄 (C_{H2} 및 C_{H3})의 카르복시-말단 부분 및 힌지 영역의 부분을 포함하는 항체 단편을 나타낸다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 내의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되는 부분이다. 한 Fc 단편은 무손상 항체의 파파인 소화에 의해 수득할 수 있다.

[0050] 용어 "F(ab')₂"는 무손상 항체의 펩신 소화에 의해 생성된 항체를 나타낸다. F(ab')₂ 단편은 디슬피드 결합에 의해 함께 연결된 2개의 Fab 단편 및 힌지 영역의 부분을 포함한다. F(ab')₂ 단편은 2가 항원 결합 활성을 갖고, 항원과 가교될 수 있다.

[0051] 용어 Fab'은 F(ab')₂ 단편의 환원의 생성물인 항체 단편을 나타낸다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C_{H1} 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개의 추가 잔기를 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. 본원에서, Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)에 유리 티올 기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다.

[0052] 용어 "힌지 영역"은 인간 IgG1의 Glu216으로부터 Pro230까지 스트레칭된 항체의 일부를 나타낸다 (문헌 [Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985)]). 다른 IgG 이소형의 힌지 영역은 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 IgG1 서열과 동일한 위치에 배치하여 정렬될 수 있다.

[0053] 용어 "Fv"는 단단하게 비공유 결합된, 하나의 중쇄 가변 영역 및 하나의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 구성된 항체 단편을 나타낸다. 이를 2개 도메인이 폴딩되어 6개의 초가변 루프 (H 쇄 및 L 쇄로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 상기 루프는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)도, 종종 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도로도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0054] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 용어 "단일쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 쇄로 연결되어 있는 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편을 나타낸다. 전형적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. scFv의 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; [Malmborg et al., J. Immunol. Methods 183:7-13, 1995]을 참조한다.

[0055] 용어 "디아바디"는 V_H 및 V_L 도메인 사이에 짧은 링커 (전형적으로 약 5 내지 10개의 잔기)를 갖는 scFv 단편을 구축하여 V 도메인들의 쇄내 쌍 형성이 아닌 쇄간 쌍 형성을 달성함으로써 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성시켜 제조된 작은 항체 단편을 나타낸다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 V_H 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇄에 존재하는 2개의 "교차" sFv 단편의 이중이량체이다. 예시적인 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 기재되어 있다.

[0056] 용어 "1-아암 항체"는 (1) CH₂ 도메인, CH₃ 도메인 또는 CH₂-CH₃ 도메인을 포함하는 폴리펩티드 결합에 의해 연결된 가변 도메인; 및 (2) 가변 도메인이 결여된 제2 CH₂, CH₃ 또는 CH₂-CH₃ 도메인을 포함하는 항체를 나타낸다. 1-아암 항체는 3가지 폴리펩티드: (1) 가변 도메인 (예를 들어, VH), CH₁, CH₂ 및 CH₃을 포함하는 제1 폴리펩티드, (2) 가변 도메인 (예를 들어, VL) 및 CL 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드, 및 (3) CH₂ 및 CH₃ 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 1-아암 항체는 불변 중쇄를 연결하는 디슬피드 결합을 형성하는 2개의 시스테인 잔기를 함유하는 부분적 힌지 영역을 가질 수 있다. 전형적으로, 1 아암 항체의 가변 도메인은 항원 결합 영역을 형성한다. 특정 예에서, 1 아암 항체의 가변 도메인은 단일 가변 도메인이고, 여기서 각각의 단일 가변 도메인은 항원 결합 영역이다.

[0057] 용어 "단일 도메인 항체" (sdAb) 또는 "단일 가변 도메인 (SVD) 항체"는 단일 가변 도메인 (VH 또는 VL)이 항원 결합을 부여하는 항체를 나타낸다. 즉, 단일 가변 도메인은 표적 항원을 인식하여 결합하기 위해 또 다른 가변 도메인과 상호작용할 필요가 없다. 단일 도메인 항체의 예는 낙타류 (라마 및 낙타) 및 연골성 어류 (예를 들어, 너스 상어)로부터 유래된 것 및 인간 및 마우스 항체로부터 재조합 방법으로부터 유래된 것을 포함한다 (문

현 [Nature (1989) 341:544-546]; [Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56]; [Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235]; [Trends Biotechnol (2003):21:484-490]; WO 2005/035572; WO 03/035694; [Febs Lett (1994) 339:285-290]; WO00/29004; WO 02/051870).

[0058] 용어 "선형 항체"는 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]에 기재된 항체를 나타낸다. 간략하게, 이들 항체는 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 병렬식 Fd 절편 ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0059] 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 나타내고, 즉, 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되며 고도로 특이적이다. 추가로, 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단일결정자에 대해 지시된다. 이러한 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 이들이 상이한 항체에 의해 오염되지 않는 상태로 합성될 수 있다는 점에서 유익하다. 수식어구 "모노클로날"은 항체들의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정 방법에 의한 항체 생성을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용될 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al. (1975) Nature 256:495]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, US 4816567; US 5807715 참조)에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한, 예를 들어 문헌 [Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628]; [Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597]에 기재된 기술을 사용하여 과지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0060] "무손상 항체"는 VL 및 VH 도메인, 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3 을 포함하는 항체를 나타낸다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 무손상 항체는 항체의 Fc 불변 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에서 기인하는 생물학적 활성을 지칭하는 하나 이상의 "이펙터 기능"을 가질 수 있다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합; 보체-의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 및 세포 표면 수용체, 예컨대 B 세포 수용체의 하향 조절을 포함한다.

[0061] 무손상 항체는 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 상이한 "클래스"로 배정될 수 있다. 5가지 주요 클래스의 무손상 이뮤노글로불린 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이 중 몇 가지는 "서브클래스" (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 나뉠 수 있다. 상이한 클래스의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 주지되어 있다. Ig 형태는 힌지-변형 또는 힌지가 없는 형태를 포함한다 (문헌 [Roux et al. (1998) J. Immunol. 161:4083-4090]; [Lund et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256]; US 2005/0048572; US 2004/0229310).

[0062] "ErbB 수용체"는 그 구성원이 세포 성장, 분화 및 생존에 중요한 ErbB 수용체 패밀리 속하는 수용체 단백질이다. ErbB 수용체 패밀리는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 또는 p185neu), HER3 (ErbB3) 및 HER4 (ErbB4 또는 tyro2)를 포함하는 4가지 특징적인 구성원을 포함한다. 항-ErbB2 항체의 패널은 인간 유방 종양 세포주 SKBR3을 사용하여 특성화된다 (문헌 [Hudziak et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172]). 최대 억제는 세포 증식을 56% 억제하는 4D5로 불리는 항체로 수득하였다. 패널 내의 다른 항체는 상기 검정보다 더 낮은 수준으로 세포 증식을 감소시켰다. 항체 4D5는 ErbB2-과다발현 유방 종양 세포 주를 TNF- α (미국 특허 번호 5,677,171)의 세포독성 효과에 대해 감수성으로 만드는 것으로 추가로 밝혀졌다. 문헌 [Hudziak et al.]에서 논의된 항-ErbB2 항체는 문헌 [Fendly et al. (1990) Cancer Research 50:1550-1558]; [Kottts et al. (1990) In Vitro 26(3):59A]; [Sarup et al. (1991) Growth Regulation 1:72-82]; [Shepard et al. J. Clin. Immunol. 11(3):117-127]; [Kumar et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986]; [Lewis et al. (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263]; [Pietras et al. (1994) Oncogene 9:1829-1838]; [Vitetta et al. (1994) Cancer Research 54:5301-5309]; [Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665]; [Scott et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:14300-5]; [D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:7202-7206]; [Lewis et al. (1996) Cancer Research 56:1457-1465]; 및 [Schaefer et al. (1997) Oncogene 15:1385-1394]에서 추가로 특성화된다.

[0063] ErbB 수용체는 일반적으로 ErbB 리간드와 결합할 수 있는 세포의 도메인, 친유성 막횡단 도메인, 보존된 세포내 티로신 키나제 도메인, 및 인산화될 수 있는 여러개의 티로신 잔기를 함유하는 카르복실-말단 신호전달 도메인

을 포함할 것이다. ErbB 수용체는 "천연 서열" ErbB 수용체 또는 그의 "아미노산 서열 변이체"일 수 있다. ErbB 수용체 패밀리의 여러 구성원은 공지되어 있고, EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3), 및 ErbB4 (HER4)를 포함한다.

[0064] 용어 "ErbB1", "표피 성장 인자 수용체", "EGFR" 및 "HER1"은 본원에서 교환가능하게 사용되고, 예를 들어 문헌 [Carpenter et al. (1987) Ann. Rev. Biochem., 56:881-914]에 개시된 바와 같은 EGFR (그의 자연 발생 돌연변이체 형태 포함 (예를 들어, 문헌 [Humphrey et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 87:4207-4211]에서의 결실 돌연변이체 EGFR))을 나타낸다. 용어 erbB1은 EGFR 단백질 생성물을 코딩하는 유전자를 나타낸다. HER1에 대한 항체는 예를 들어 문헌 [Murthy et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 252:549-560] 및 WO 95/25167에 기재되어 있다.

[0065] 용어 "ERRP", "EGF-수용체 관련 단백질", "EGFR 관련 단백질" 및 "표피 성장 인자 수용체 관련 단백질"은 본원에서 교환가능하게 사용되고, 예를 들어 미국 특허 번호 6,399,743 및 미국 공보 번호 2003/0096373에 개시된 바와 같은 ERRP를 나타낸다.

[0066] 용어 "ErbB2" 및 "HER2"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 예를 들어 문헌 [Semba et al. (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 82:6497-6501] 및 [Yamamoto et al. (1986) Nature, 319:230-234]에 기재된 바와 같은 인간 HER2 단백질 (진뱅크(Genbank) 등록 번호 X03363)을 나타낸다. 용어 "erbB2"는 인간 ErbB2를 코딩하는 유전자를 나타내고, "neu"는 래트 p185neu를 코딩하는 유전자를 나타낸다.

[0067] 용어 "ErbB3" 및 "HER3"은 본원에서 교환가능하게 사용되고, 예를 들어 미국 특허 번호 5,183,884 및 5,480,968 뿐만 아니라 문헌 [Kraus et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86:9193-9197]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드를 나타낸다. ErbB3에 대한 항체는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 번호 5,183,884, 5480968 및 WO 97/35885에 기재되어 있다.

[0068] 본원에서 용어 "ErbB4" 및 "HER4"는 교환가능하게 사용되고, 예를 들어 EP 특허 출원 번호 599,274; 문헌 [Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1746-1750]; 및 [Plowman et al. (1993) Nature 366:473-475]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드 (예를 들어, WO 99/19488에 개시된 바와 같은 그의 이소형 포함)를 나타낸다. HER4에 대한 항체는 예를 들어 WO 02/18444에 기재된다.

[0069] ErbB 수용체에 대한 항체는 예를 들어 산타 크루즈 바이오테크놀로지, 인크.(Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (미국 캘리포니아주)를 포함하는 다수의 공급원으로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0070] 용어 "아미노산 서열 변이체"는 천연 서열 폴리펩티드와 어느 정도 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 나타낸다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 천연 ErbB 리간드의 적어도 하나의 수용체 결합 도메인 또는 천연 ErbB 수용체의 적어도 하나의 리간드 결합 도메인과의 서열 동일성이 적어도 약 70%일 것이거나, 또는 이들은 상기 수용체 또는 리간드 결합 도메인과의 서열 상동성이 적어도 약 80% 또는 적어도 약 90%일 것이다. 아미노산 서열 변이체는 천연 아미노산 서열의 아미노산 서열내의 특정 위치에서 치환, 결실, 및/또는 삽입을 보유한다. 아미노산은 통상의 명칭, 1-문자 코드 및 3-문자 코드에 의해 표시된다.

[0071] "서열 동일성"은 아미노산 서열 변이체에서 최대 퍼센트의 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬시키고 필요하다면 캡을 도입한 후 동일한 잔기의 백분율로서 정의된다. 이러한 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 주지되어 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램의 하나는 "Align 2" (저자: 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.), 1991년 12월 10일 미국 저작권청(DC 20559 워싱턴주)에 사용자 문서와 함께 제출됨)이다.

[0072] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구, 및 대식 세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식한 다음, 연속해서 이러한 표적 세포의 용해를 유발시키는 세포-매개성 반응을 나타낸다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, (1991) "Annu. Rev. Immunol." 9:457-92]의 페이지 464의 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정, 예컨대 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이렉터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심있는 분자의 ADCC 활성을 예를 들어 문헌 [Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가할 수 있다.

[0073] "인간 이렉터 세포"는 하나 이상의 불변 영역 수용체 (FcR)를 발현하고 이렉터 기능을 수행하는 백혈구이다.

전형적으로, 이펙터 세포는 적어도 Fc γ RIII을 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 살해 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 이펙터 세포는 그의 천연 공급원, 예를 들어 혈액 또는 PBMC로부터 단리할 수 있다.

[0074] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 불변 영역에 결합하는 수용체를 기재하기 위해 사용된다. 전형적으로, FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하며, 이들은 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 주로 그의 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (문헌 [M. in Daeron, "Annu. Rev. Immunol." 15:203-234 (1997)]의 개관 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, "Annu. Rev. Immunol."., 9:457-92 (1991)]; [Capel et al. (1994) Immunomethods 4:25-34]; 및 [de Haas et al. (1995) J. Lab. Clin. Med. 126:330-41]에서 검토된다. 다른 FcR이 본원에서 용어 "FcR"에 포함된다. 상기 용어는 또한, 모계 IgG를 태아에게 전이시키는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다 (문헌 [Guyer et al. (1976) J. Immunol., 117:587] 및 [Kim et al. (1994) J. Immunol. 24:249]).

[0075] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 나타낸다. 보체 활성화 경로는 동족 항원과 복합체화한 분자 (예를 들어, 항체)에 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al. J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0076] 용어 "천연 항체"는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 이종사량체 당단백질인 자연 발생의 기본적인 4-쇄 항체 단위를 나타낸다 (IgM 항체는 J 쇄라 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본적인 이종사량체 단위로 이루어져 있어서 10개의 항원 결합 부위를 함유하고, 분비된 IgA 항체는 중합되어 J 쇄와 함께 기본적인 4-쇄 단위를 2-5개 포함하는 다가 조립체를 형성할 수 있음). IgG의 경우, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 쇄는 1개의 공유 디슬피드 결합에 의해 H 쇄에 연결되지만, 2개의 H 쇄는 H 쇄 이소형에 따라 1개 이상의 디슬피드 결합에 의해 서로 연결된다. 또한, 각 H 쇄 및 L 쇄에는 일정한 간격을 두고 이격된 쇄내 디슬피드 브릿지가 존재한다. 각 H 쇄는 N-말단에 가변 도메인 (V_H)을 가지며, 이어서 α 및 γ 쇄 각각의 경우에 3개의 불변 도메인 (C_H), μ 및 ϵ 이소형의 경우에 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각 L 쇄는 N-말단에 가변 도메인 (V_L), 이어서 다른쪽 말단에 불변 도메인 (C_L)을 갖는다. V_L 은 V_H 와 정렬되고, C_L 은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 인터페이스를 형성한다고 여겨진다. V_H 및 V_L 의 쌍 형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994] (페이지 71 및 제6장)을 참조한다. 임의의 척추동물 종의 L 쇄는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 및 람다라고 불리는 명백히 상이한 2가지 유형 중 하나에 배정될 수 있다.

[0077] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분들이 항체들 사이에서 광범위한 서열 상이성을 나타낸다는 사실을 나타내고, 각 특정 항체의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다. 그러나, 가변성이 항체 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 둘 다 내에 초가변 영역이라 불리우는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결되고 주로 β -시트 형태를 취하는 4개의 FR을 각각 포함하며, 이를 초가변 영역은 상기 β -시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇄의 초가변 영역은 FR에 의해 아주 근접하게 함께 결합되어 있고, 다른 쇄로부터의 초가변 영역은 항체의 항원-결합 부위 형성에 기여한다 [문헌 [Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD] 참조]. 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다.

[0078] 용어 "초가변 영역", "HVR" 또는 "HV"은 서열에서 초가변이고/거나 구조적으로 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H_1 , H_2 , H_3) 및 VL 내에 3개 (L_1 ,

L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중에서 가장 높은 다양성을 나타내고, 특히 H3은 항체에 정밀한 특이성을 부여하는데 특정적인 역할을 수행한다고 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000)]; [Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)]을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄의 부재하에 기능적이고 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993)]; [Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0079] 많은 HVR 설명이 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기초로 하며, 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 대신, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 나타낸다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 HVR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석을 기초로 한다. 이들 각각의 HVR로부터의 잔기를 아래 나타낸다.

루프 카바트	AbM	코티아	접촉
---	---	-----	-----
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
		(카바트 넘버링)	
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
		(코티아 넘버링)	
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0080]

HVR은 다음과 같이 "확장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3) 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0082]

"프레임워크 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 확인되는 4개의 FR를 갖는다. CDR이 카바트에 따라 정의되는 경우, 경쇄 FR 잔기는 약 잔기 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) 및 98-107 (LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기에서 약 잔기 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) 및 103-113 (HCFR4)에 위치한다. CDR이 초가변 루프의 아미노산 잔기를 포함하는 경우, 경쇄 FR 잔기는 경쇄의 약 잔기 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) 및 97-107 (LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기의 약 잔기 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) 및 102-113 (HCFR4)에 위치한다. 일부 경우에, CDR이 카바트에 의해 정의된 바와 같은 CDR의 아미노산과 초가변 루프의 아미노산 둘 다를 포함하는 경우에는 FR 잔기가 그에 따라 조정될 것이다. 예를 들어, CDRH1이 아미노산 H26-H35를 포함하는 경우, 중쇄 FR1 잔기는 위치 1-25에 존재하고 FR2 잔기는 위치 36-49에 존재한다.

[0083]

"인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이谬노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔하게 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이谬노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열들의 하위군은 카바트에서와 같은 하위군이다. 특정 예에서, VL의 경우, 하위군은 카바트에서와 같은 하위군 카파 I이다. 특정 예에서, VH의 경우, 하위군은 카바트에서와 같은 하위군 III이다.

[0084]

"키메라 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 항체, 뿐만 아니라 이러한 항체의 단편 (단, 이는 원하는 생물학적 활성을 나타냄)을 나타낸다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)]). 키메라 항체는 비인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 영장류화 항체를 포함한다.

[0085]

비인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 원하는 항체 특이성, 친화성 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 교체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에 없는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 임의로, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 부분, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0086]

여기서 사용된 "복합체" 또는 "복합체화된"은 웨티드 결합이 아닌 결합 및/또는 힘 (예를 들어, 반 데르 발스, 소수성, 친수성 힘)을 통해 서로 상호작용하는 2개 이상의 분자의 회합을 나타낸다. 특정 예에서, 복합체는 이종다량체성이다. 본원에 사용된 "단백질 복합체" 또는 "폴리웨티드 복합체"는 단백질 복합체 내의 단백질에 접합된 비-단백질 엔티티 (예를 들어, 화학 분자, 예컨대 독소, 가교제 또는 검출제를 포함하나 이에 제한되지 않음)를 갖는 복합체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0087]

본원에 사용된 용어 "이종다량체" 또는 "이종다량체성"은 비-웨티드성 공유 결합 (예를 들어, 디슬피드 결합) 및/또는 비공유 상호작용 (예를 들어, 수소 결합, 이온성 결합, 반 데르 발스 힘 및 소수성 상호작용)에 의해 서로 상호작용하는 2개 이상의 폴리웨티드를 기재하고, 여기서 적어도 2개의 폴리웨티드는 서로 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

[0088]

분자 표적 또는 관심있는 항원에 "결합하는" 항체는 항체가 항원을 발현하는 세포 또는 조직을 표적화할 때 유용하도록 충분한 친화도로 항원에 결합할 수 있고, 다른 단백질과 유의하게 교차반응하지 않는 것이다. 이러한 항체는 예를 들어 진단 및/또는 치료제 및/또는 연구 도구로서 유용하다. 통상적으로, "비-표적" 단백질에 대한 항체의 결합 정도는 전형적인 측정 방법, 예를 들어 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사성 면역 침전 (RIA) 또는 ELISA에 의해 결정시 그의 특정 표적 단백질에 대한 항체 결합의 약 10% 미만일 것이다.

[0089]

용어 "특이적인 결합" 또는 "에 특이적으로 결합하는" 또는 "에 대해 특이적인"은 표적 분자, 예를 들어 특정 폴리웨티드 또는 특정 폴리웨티드 표적 상의 에피토프에 대한 항체의 결합을 나타내고, 비-특이적인 상호작용과 측정가능하게 상이한 결합 (예를 들어, 비-특이적 상호작용은 소 혈청 알부민 또는 카세인에 대한 결합일 수 있음)을 의미한다. 특이적 결합은, 예를 들어 표적 분자의 결합을 대조군 분자의 결합과 비교하여 결정함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적과 유사한 대조군 분자, 예를 들어 과량의 비표지 표적과의 경쟁에 의해 측정할 수 있다. 이 경우, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지 표적에 의해 경쟁적으로 억제된다면 특이적 결합이다. 본원에 사용된 특정한 폴리웨티드 또는 특정한 폴리웨티드 표적 상의 에피토프에 "특이적인 결합" 또는 그에 "특이적으로 결합하는" 또는 그에 대해 "특이적인"이라는 용어는, 예를 들어 표적에 대해 적어도 약 200 nM, 대안적으로 적어도 약 150 nM, 대안적으로 적어도 약 100 nM, 대안적으로 적어도 약 60 nM, 대안적으로 적어도 약 50 nM, 대안적으로 적어도 약 40 nM, 대안적으로 적어도 약 30 nM, 대안적으로 적어도 약 20 nM, 대안적으로 적어도 약 10 nM, 대안적으로 적어도 약 8 nM, 대안적으로 적어도 약 6 nM, 대안적으로 적어도 약 4 nM, 대안적으로 적어도 약 2 nM, 대안적으로 적어도 약 1 nM 또는 그 초과의 Kd를 갖는 분자에서 나타날 수 있다. 특정 예에서, 용어 "특이적 결합"은 분자가 임의의 다른 폴리웨티드 또는 폴리웨티드 에피토프에 대해 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리웨티드 또는 특정 폴리웨티드 상의 에피토프에 결합하는 결합을 나타낸다. 표적 분자의 예는 혈청 가용성 단백질 및 이들의 수용체, 예컨대 시토카인 및 시토카인 수용체, 어드헤신, 성장 인자 및 이들의 수용체, 호르몬, 바이러스 입자 (예를 들어, RSV F 단백질, CMV, StaphA, 인플루엔자, C형 간염 바이러스), 미생물 (예를 들어, 박테리아 세포 단백질, 진균 세포), 어드헤신, CD 단백질 및 이들의 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0090]

"결합 친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 나타낸다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내재적 결합 친화도를 나타낸다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 표시될 수 있다. 예를 들어, Kd는 약 200 nM, 150

nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, 또는 이보다 강할 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원과 서서히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원과 보다 신속하게 결합하고 보다 오랫 동안 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0091] 본원에 사용된 "Kd" 또는 "Kd 값"은 예를 들어 25°C에서 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크. (BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이) 및 고정된 항원 CM5 칩 (약 10 반응 단위 (RU))을 이용한 표면 플라즈몬 공명 검정을 이용하여 측정된 해리 상수를 나타낸다. 간략하게, 이 방법은 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 사용한다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 µg/ml (약 0.2 µM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 µl/분의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (예를 들어, 0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 µl/분의 유량으로 25 °C에서 0.05% 트윈 20을 갖는 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅함으로써 단순 일-대-일 랜덤 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 항체의 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 10^6 M⁻¹ s⁻¹을 초과하면, 분광계, 예컨대 흐름-정지가 장착된 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(Aminco) 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정된 바와 같이, 온-레이트는 25°C에서 증가하는 농도의 항원의 존재하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)에서의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0092] "유리 시스테인 아미노산"은 폴리펩티드, 예를 들어 항체 또는 항체 단편에서 시스테인 아미노산 잔기를 나타내고, 이는 티올 관능기 (-SH)를 갖고, 분자내 또는 분자간 디슬피드 브릿지로서 쌍을 형성하지 않는다. 특정 예에서, 유리 시스테인 아미노산 잔기는 예를 들어 미국 특허 공보 번호 2007/0092940 및 문헌 [Junutula, J. R., et al., J Immunol Methods 332(1-2):41-52 (2008)]에 기재된 바와 같은 모 항체로 조작된다.

[0093] 용어 "티올 반응성 값"은 유리 시스테인 아미노산의 반응성에 대한 정량적 특성이다. 티올 반응성 값은 티올-반응성 시약과 반응하는, 시스테인 조작된 항체 내의 유리 시스테인 아미노산의 비율이고, 최대 1의 값으로 전환된다. 예를 들어, 100% 수율로 티올-반응성 시약, 예컨대 비오틴-말레이이미드 시약과 반응하여 비오틴-표지된 항체를 형성하는, 시스테인 조작된 항체 상의 유리 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 1.0이다. 80% 수율로 티올-반응성 시약과 반응하는, 동일한 또는 상이한 모 항체로 조작된 상이한 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0.8이다. 티올-반응성 시약과 전혀 반응하지 못하는, 동일한 또는 상이한 모 항체로 조작된 상이한 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0이다. 특정 시스테인의 티올 반응성 값 결정은 ELISA 검정, 질량 분광분석법, 액체 크로마토그래피, 오토라디오그래피, 또는 상이한 정량적 분석 시험에 의해 수행할 수 있다.

[0094] "모 항체"는 하나 이상의 항체 단편의 공급원인 항체이다. 모 항체는 천연 또는 야생형 서열을 포함할 수 있다. 모 항체는 그로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 하나 이상의 시스테인 잔기로 교체된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 모 항체는 상이한 천연, 야생형, 또는 변형된 형태의 항체에 비해 이미 존재하는 아미노산 서열 변형 (예컨대, 부가, 결실 및/또는 치환)을 가질 수 있다. 모 항체는 관심있는 표적 항원, 예를 들어 생물 학상 중요한 폴리펩티드에 대해 지시될 수 있다. 모 항체는 비폴리펩티드 항원 (예컨대, 종양-관련 당지질 항원; 예를 들어 미국 특허 번호 5,091,178 참조)에 대해 지시될 수 있다. 예시적인 모 항체는 세포 표면 및 막 획단 수용체 및 종양-관련 항원 (TAA)에 대한 친화도 및 선택성을 갖는 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0095] "단리된" 항체 또는 폴리펩티드는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 예를 들어 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 전형적으로, 항체 또는 폴리펩티드는 (1) 로우리 방법으로 측정시에 폴리펩티드를 95 중량% 초과로, 또는 99 중량% 초과로, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용함으로써 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기를 적어도 15개 수득하는데 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 은 염색을 사용한 환원 또는 비-환원 조건하에서의 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 때까지 정제될 것이다. 단리된 항

체 또는 폴리펩티드에는 재조합 세포 내의 계내 항체 또는 폴리펩티드를 포함하는데, 이는 항체 또는 폴리펩티드의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체 또는 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

- [0096] 어구 "실질적으로 균질성인", "실질적으로 균질한 형태" 및 "실질적인 균질성"은 생성물이 원하지 않은 폴리펩티드 조합 (예를 들어, 동종다량체)으로부터 유래된 부산물이 실질적으로 결여되는 것을 나타내는데 사용된다. 순도와 관련하여 표현된 실질적인 균질성은 부산물의 양이 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 4%, 3%, 2% 또는 1 중량%을 초과하지 않거나, 1 중량% 미만인 것을 의미한다. 전형적으로, 부산물은 5% 미만이다.
- [0097] 본원에 사용된 "Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위"는 Lys-C 엔도펩티다제에 의해 C-말단에 절단될 수 있는 아미노산 서열의 리신 잔기이다. Lys-C 엔도펩티다제는 리신 잔기의 C-말단에 절단된다.
- [0098] 달리 나타내지 않는 한, 용어 "모노클로날 항체 4D5"는 뮤린 4D5 항체 (ATCC CRL 10463)의 항원 결합 잔기 또는 이로부터 유래된 항원 결합 잔기를 갖는 항체를 나타낸다. 예를 들어, 모노클로날 항체 4D5는 뮤린 모노클로날 항체 4D5 또는 그의 변이체, 예컨대 인간화 4D5일 수 있다. 예시적인 인간화 4D5 항체는 미국 특허 번호 5,821,337에서와 같은 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 (트라스투주맙, 헤르셉틴®)을 포함한다.
- [0099] 용어 "치료하다" 및 "치료"는 치료적 치료 및 예방 또는 방지 수단 둘 다를 나타내고, 그의 목적은 원하지 않은 생리적 변화 또는 장애를 방지하거나 치료시키는 것 (줄이는 것)이다. 유익하거나 원하는 임상 결과에는 검출 가능하든 검출불가능하든, 증상의 경감, 질환 정도의 약화, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 감속, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 차도 (부분적이든 전체적이든)가 포함하나 이에 제한되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않을 경우에 예상되는 생존과 비교하여 생존을 연장시키는 것 (예를 들어, 암 치료에서와 같음)을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 대상체에는 이미 해당 상태 또는 장애를 갖는 대상체 뿐만 아니라 이러한 상태 또는 장애에 걸리기 쉬운 대상체 또는 상기 상태 또는 장애를 방지하고자 하는 대상체가 포함된다.
- [0100] 용어 "치료 유효량"은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 항체, 항체 단편 또는 유도체, 예를 들어 다중특이적 항체 또는 항체 유사체의 양을 나타낸다. 종양 (예를 들어, 암성 종양)의 경우에, 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 다중특이적 항체 또는 항체 유사체)의 치료 유효량은 암 세포의 수를 감소시킬 수 있고/거나; 원발성 종양 크기를 감소시킬 수 있고/거나; 말초 기관 내로의 암 세포 침윤을 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고 바람직하게는 정지)시킬 수 있고/거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고 바람직하게는 정지)시킬 수 있고/거나; 종양 성장을 어느 정도까지 억제시킬 수 있고/거나; 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도까지 완화시킬 수 있다. 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 다중특이적 항체 또는 항체 유사체)이 암 세포의 성장을 방지하고/하거나 존재하는 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도로, 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법의 경우, 생체내 효능은 예를 들어 생존 기간, 질환 진행까지의 시간 (TTP), 반응률 (RR), 반응 지속기간, 및/또는 삶의 질을 평가하여 측정될 수 있다.
- [0101] "감소 또는 억제한다"란 20% 또는 그 초과, 또는 50% 또는 그 초과, 또는 75%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과의 전반적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 감소 또는 억제는 치료할 장애의 증상, 전이의 존재 또는 크기, 원발성 종양의 크기, 또는 혈관신생 장애에서 혈관의 크기 또는 수를 나타낼 수 있다.
- [0102] 용어 "생체이용률"은 환자에게 투여된 주어진 량의 약물의 전신 이용률 (즉, 혈액/혈장 수준)을 나타낸다. 생체이용률은 투여된 투여 형태로부터 전신 순환계에 도달하는 약물의 시간 (속도) 및 총량 (정도) 둘 다의 측정치를 나타내는 절대적인 용어이다.
- [0103] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리적 상태를 지칭하거나 기재한다. "종양"은 1개 이상의 암성 세포를 포함한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병 또는 림프양 악성종양을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암 (예를 들어, 상피 편평세포암), 폐암, 예를 들어 소세포 폐암, 비소세포 폐암 ("NSCLC"), 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포 암, 위암, 예를 들어 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종 뿐만 아니라 두경부암을 포함한다.
- [0104] "ErbB-발현 암"은 세포 표면에 존재하는 ErbB 단백질을 갖는 세포를 포함하는 암이다. "ErbB2-발현 암"은 세포 표면에 충분한 수준의 ErbB2를 생성하여 항-ErbB2 항체가 그에 결합할 수 있고 그 암에 대해 치료 효과를 가질

수 있는 암이다.

[0105] 항원성 수용체를 "과다발현하는" 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해, 그의 세포 표면에 상당히 고 수준의 수용체, 예컨대 ErbB2를 갖는 것이다. 이러한 과다발현은 유전자 증폭에 의해 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 초래될 수 있다. 수용체 과다발현은 세포 표면상에 존재하는 수용체 단백질의 증가된 수준을 평가함으로써 진단 또는 예후 검정 (예를 들어, 면역조직화학 검정; IHC)에서 결정할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 예를 들어 형광 계내 혼성화 (FISH; WO 98/45479 참조), 서던 블로팅 또는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예컨대 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)을 통해 세포 내 수용체-코딩 핵산의 수준을 측정할 수 있다.

[0106] ErbB2 (HER2)를 과다발현하는 종양은 세포 당 발현된 HER2 분자의 카피의 수에 해당하는 면역조직화학 스코어에 의해 평가되고, 생화학적으로 결정될 수 있다: 0 = 0-10,000개 카피/세포, 1+ = 적어도 약 200,000개 카피/세포, 2+ = 적어도 약 500,000개 카피/세포, 3+ = 약 1-2 x 10⁶개 카피/세포. 티로신 키나제의 리간드-비의존성 활성화를 일으키는 3+ 수준에서의 HER2의 과다발현 (문헌 [Hudziak et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163])이 대략 30%의 유방암에서 발생하고, 이들 환자에서 비재발 생존 및 전체 생존은 감소한다 (문헌 [Slamon et al. (1989) Science, 244:707-712]; [Slamon et al. (1987) Science, 235:177-182]).

[0107] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ⁶⁰C, 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 독소, 예컨대 소분자 독소, 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 예컨대 그의 합성 유사체 및 유도체를 포함한다.

[0108] 본원에서 "알레르기성 또는 염증성 장애"는 개체의 면역계의 과다활성화로부터 발생하는 질환 또는 장애이다. 예시적인 알레르기성 또는 염증성 장애는 천식, 건선, 류마티스 관절염, 아토피성 피부염, 다발성 경화증, 전신 루푸스, 홍반, 습진, 기관 이식, 연령-관련 황반 변성, 크론병, 케양성 결장염, 호산구성 식도염, 및 염증과 관련된 자가면역 질환을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0109] 본원에서 "자가면역 질환"은 개체의 자기 자신의 조직 또는 기관 또는 동시 분리계로부터 상기 자기 자신의 조직 등에 대해 발생하는 질환 또는 장애 또는 그의 증상 또는 그로부터 발생하는 상태이다. 많은 이러한 자가면역 및 염증성 장애에서, 고감마글로불린혈증, 높은 수준의 자가항체, 조직 내의 항원-항체 복합체 침착물, 코르티코스테로이드 또는 면역억제 처치료부터의 이점, 및 환부 조직 내의 림프양 세포 응집물을 포함하나 이에 제한되지 않는 수많은 임상 및 실험 마커가 존재할 수 있다. B-세포 매개 자가면역 질환에 대해 임의의 특정 이론에 제한되지 않지만, B 세포는 자가항체 생성, 면역 복합체 형성, 수지상 및 T-세포 활성화, 시토카인 합성, 직접 케모카인 방출 및 이소성 림프형성을 위한 핵심 병소의 제공을 포함하여, 많은 기계적인 경로를 통한 인간 자가면역 질환에서 발병 효과를 보이는 것으로 생각된다. 각각의 이러한 경로는 자가면역 질환의 병리학에 다양한 정도로 참여할 수 있다. 자가면역 질환은 기관-특이적 질환 (즉, 면역 반응은 내분비계, 조혈계, 피부, 심폐계, 위장관계 및 간계, 신장계, 갑상선, 귀, 신경근육계, 중추신경계 등과 같은 기관계에 대해 특이적으로 작용함) 또는 다수의 기관계에 영향을 줄 수 있는 전신 질환 (예를 들어, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 류마티스 관절염, 다발성 근염 등)일 수 있다.

[0110] 용어 "세포증식억제"는 세포의 기능을 제한하는 효과, 예컨대 세포의 성장 또는 증식을 제한하는 효과를 나타낸다.

[0111] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 예를로티닙 (타르세바(TARCEVA)®, 제넨테크/오에스아이 팜.(OSI Pharm.)), 보르테조닙 (벨케이드(VELCADE)®, 밀레니엄 팜.(Millenium Pharm.)), 폴베스트란트 (파슬로텍스(FASLODEX)®, 아스트라제네카(Astrazeneca)), 수텐트 (SU11248, 화이자(Pfizer)), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®, 노파르티스(Novartis)), 이마티닙 메실레이트 (글리벡(GLEEVEC)®, 노파르티스), PTK787/ZK 222584 (노파르티스), 옥살리플라틴 (엘록사틴(Eloxatin)®, 사노피(Sanofi)), 5-FU (5-플루오로우라실), 류코보린, 라파마이신 (시롤리무스, 라파문(RAPAMUNE)®, 와이어쓰(Wyeth)), 라파티닙 (GSK572016, 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)), 로나파르닙 (SCH 66336), 소라페닙 (BAY43-9006, 바이엘 랩스.(Bayer Labs.)), 및 캐퍼티닙 (이레사(IRESSA)®, 아스트라제네카), AG1478, AG1571 (SU 5271, 수젠(Sugen)), 알킬화

제, 예컨대 티오텐파 및 시톡산(CYTOXAN)[®] 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 퍼포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸로멜라민; 아세토게닌 (특히, 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로로나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜랄란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1 (문헌 [Angew Chem Intl. Ed. Engl. (1994) 33: 183-186]); 디네미신 (디네미신 A 포함); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색단백질 엔디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)[®] 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 (예컨대, 미토마이신 C), 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사제, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스탈론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항아드레날, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산보충물, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 테메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 암사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 웬토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 다당류 복합체 (제이에이치에스 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오텐파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL)[®] 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스크립 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스頓), 아브락산(ABRAXANE)TM 파클리탁셀의 크레모포르-무함유, 알부민-조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샤움버그), 및 탁소테레(TAXOTERE)[®] 독세탁셀 (론-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로람부실; 쟈자르(GEMZAR)[®] 쟈시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE)[®] 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈; 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0112] 이러한 "화학요법제"의 정의에는 또한 (i) 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항호르몬제, 예컨대 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조정자 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바데스(NOLVADEX)[®] 타목시펜 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON) · 토레미펜, (ii) 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)[®] 메게스트론

아세테이트, 아로마신(AROMASIN)® 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)® 보로졸, 페마라® 레트로졸, 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® 아나스트로졸, (iii) 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체), (iv) 아로마타제 억제제, (v) 단백질 키나제 억제제, (vi) 지질 키나제 억제제, (vii) 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식과 관련이 있는 신호전달 경로에서의 유전자 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf 및 H-Ras, (viii) 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, 안지오자임(ANGIOZYME)® 리보자임) 및 HER2 발현 억제제, (ix) 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신 및 박시드(VAXID)® 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 르르토테칸(LURTOTECAN)® 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH, (x) 항혈관신생제, 예컨대 베바시주맙 (아바스틴(AVASTIN)®, 제넨테크), 및 (xi) 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 및 유도체를 포함한다.

[0113]

"성장 억제제"가 본원에 사용되는 경우, 이것은 세포의 성장을 시험관내 또는 생체내 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 상이한 단계에) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 전통적인 M기 차단제로는 빈카 (예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산, 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 들 수 있다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지로 이어질 수 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히, p. 13)에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목 나무에서 유래된 항암 약물이다. 유럽형 주목 나무에서 유래된 도세탁셀 (탁소테레®, 론-프랑 로러)은 파클리탁셀 (탁솔®, 브리스톨-마이어스 스크립트)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터의 미세소관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세소관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제를 야기한다.

[0114]

본원에 사용된 "항암 요법"은 대상체에서 암을 감소시키거나 억제하는 치료를 나타낸다. 항암 요법의 예에는 세포독성 방사선요법 뿐만 아니라 치료 유효량의 세포독성제, 화학요법제, 성장 억제제, 암 백신, 혈관신생 억제제, 전구약물, 시토카인, 시토카인 길항제, 코르티코스테로이드, 면역억제제, 항구토제, 항체 또는 항체 단편, 또는 진통제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0115]

"시토카인 길항제"는 적어도 이상의 시토카인의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나 또는 중화시키는 분자를 의미한다. 예를 들어, 시토카인 길항제는 시토카인 발현 및/또는 분비의 억제에 의해, 또는 시토카인 또는 시토카인 수용체에의 결합에 의해 시토카인 활성을 억제할 수 있다. 시토카인 길항제는, 항체, 합성 또는 천연-서열 웹티드, 이뮤노어드헤신, 및 시토카인 또는 시토카인 수용체에 결합하는 소분자 길항제를 포함한다. 시토카인 길항제는 임의로 세포독성제와 접합 또는 융합된다. 예시적인 TNF 길항제는 에타네르셉트 (엔브렐(ENBREL)®, 인플릭시맙 (레미케이드(REMICADE)®) 및 아달리무맙 (휴미라(HUMIRA)™) 이다.

[0116]

본원에 사용된 용어 "면역억제제"는 치료되는 대상체의 면역계를 저해하거나 또는 차폐하는 작용을 하는 물질을 나타낸다. 이는 시토카인 생성을 저해하거나, 자가-항원 발현을 하향조절 또는 저해하거나, 또는 MHC 항원을 차폐하는 물질을 포함한다. 면역억제제의 예는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘 (미국 특허 번호 4,665,077 참조); 미코페놀레이트 모페틸, 예컨대 셀셉트(CELLCEPT)®, 아자티오프린 (이뮤란(IMURAN)®, 아자산(AZASAN)®/6-메르캅토퓨린; 브로모크립틴; 다나졸; 담순; 글루타르알데히드 (미국 특허 번호 4,120,649에 기재된 것과 같이 MHC 항원을 차폐함); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체; 시클로스포린 A; 스테로이드, 예컨대 코르티코스테로이드 및 글루코코르티코스테로이드, 예를 들어 프레드니손, 프레드니솔론, 예컨대 페디아프레드(PEDIAPRED)® (프레드니솔론 인산나트륨) 또는 오라프레드(ORAPRED)® (프레드니솔론 인산나트륨 경구 용액), 메틸프레드니솔론 및 텍사메타손; 메토트렉세이트 (경구 또는 피하) (류마트렉스(RHEUMATREX)®, 트렉살(TREXALL)™); 히드록시클로로퀸/클로로퀸; 술파살라진; 텔플루노미드; 시토카인 또는 시토카인 수용체 길항제 (항-인터페론-γ, -β 또는 -α 항체, 항-종양 피사 인자-α 항체 (인플릭시맙 또는 아달리무맙), 항-

TNF α 이뮤노어드헤신 (엔브렐 \circledR , 에타너셉트), 항-종양 괴사 인자- β 항체, 항-인터류킨-2 항체, 및 항-IL-2 수용체 항체 포함); 항-CD11a 및 항-CD18 항체를 포함하는 항-LFA-1 항체; 항-L3T4 항체; 이종성 항-림프구 글로불린; 폴리클로날 또는 pan-T 항체, 또는 모노클로날 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 웹티드 (WO 1990/08187); 스트렙토ки나제; TGF- β ; 스트렙토도르나제; 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 데옥시스페르구알린; 라파마이신; T-세포 수용체 (미국 특허 번호 5,114,721 (Cohen et al.)); T-세포 수용체 단편 (문헌 [Offner et al. Science, 251:430-432 (1991)]; WO 90/11294; [Ianeway, Nature, 341:482 (1989)] 및 WO 91/01133); T 세포 수용체 항체 (EP 340,109), 예컨대 T10B9; 시클로포스파미드 (시톡산) \circledR ; 담손; 페니실라민 (쿠프리민(CUPRIMINE) \circledR); 혈장 교환; 또는 정맥내 이뮤노글로불린 (IVIG)을 포함한다. 이들은 단독으로 또는 서로 조합하여, 특히 스테로이드 및 또 다른 면역억제제의 조합물을 사용할 수 있거나, 또는 이러한 조합물을 유지 용량에 이어서 스테로이드에 대한 요구를 줄이기 위한 비-스테로이드제와 함께 사용할 수 있다.

[0117] "진통제"는 대상체에서 통증을 억제 또는 저해시키는 작용을 하는 약물을 나타낸다. 예시적인 진통제는 비-스테로이드성 항-염증성 약물 (NSAID) (이부프로펜 (모트린(MOTRIN) \circledR), 나프록센 (나프로신(NAPROSYN) \circledR), 아세틸살리실산, 인도메타신, 술린닥 및 툴메틴 (염 및 그의 유도체 포함) 포함), 뿐만 아니라 발생할 수 있는 자동의 감소에 사용될 수 있는 여러 다른 약물 (항경련제 (가바펜틴, 페니토인, 카르바마제핀) 또는 트리시클릭 항우울제 포함)이 포함된다. 구체적인 예는 아세트아미노펜, 아스피린, 아미트립틸린 (엘라빌(ELAVIL) \circledR), 카르바마제핀 (테그레톨(TEGRETOL) \circledR), 페닐토인 (딜란틴(DILANTIN) \circledR), 가바펜틴 (뉴론틴(NEURONTIN) \circledR), (E)-N-바닐릴-8-메틸-6-논아미드 (캡사이신(CAPSAICIN) \circledR) 또는 신경 차단제를 포함한다.

[0118] "코르티코스테로이드"는 자연 발생 코르티코스테로이드의 효과를 모방하거나 증대시키는, 스테로이드의 일반적인 화학 구조를 갖는 여러가지 합성 또는 자연 발생 물질 중 임의의 것을 나타낸다. 합성 코르티코스테로이드의 예는 프레드니손, 프레드니솔론 (메틸프레드니솔론 포함), 텍사메타손, 트리암시놀론 및 베타메타손을 포함한다.

[0119] 본원에 사용되는 "암 백신"은 대상체에서 암에 대한 면역 반응을 자극하는 조성물이다. 전형적으로, 암 백신은 항원에 대한 면역 반응을 추가로 자극 및 증가시키는 다른 성분 (예를 들어, 아주반트)과 함께, 대상체에 대해 자가조직 (자신으로부터)이거나 또는 동종이형 (다른 것으로부터)일 수 있는 암-관련 물질 또는 세포 (항원)의 공급원으로 구성된다. 암 백신은 대상체의 면역계의 자극을 유발하여 하나 또는 여러 특이적 항원에 대한 항체를 생성하고/거나 이들 항원을 갖는 암 세포를 공격하기 위한 킬러 T 세포를 생성한다.

[0120] 본원에 사용되는 "세포독성 방사선요법"은 세포의 기능을 억제 또는 방해하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 방사선 요법을 나타낸다. 방사선 요법에는 예를 들어 외부 빔 조사, 또는 방사성 표지된 작용제, 예컨대 항체로의 요법이 포함될 수 있다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², Ra²²³, P³², 및 Lu의 방사성 동위원소)의 사용을 포함하려고 한다.

[0121] 본원에 사용된 용어 "EGFR-표적화된 약물"은 EGFR에 결합하고, 임의로는 EGFR 활성화를 억제하는 치료제를 나타낸다. 이러한 작용제의 예는 EGFR에 결합하는 항체 및 소분자를 나타낸다. EGFR에 결합하는 항체의 예는 MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (미국 특허 번호 4,943,533 (Mendelsohn et al.) 참조) 및 그의 변이체, 예컨대 키메라 225 (C225 또는 세특시맙; 에르비툭스(ERBITUX) \circledR) 및 재형성된 인간 225 (H225) (WO 96/40210 참조, 임클론 시스템즈 인크.(Imclone Systems Inc.)); 유형 II 돌연변이체 EGFR에 결합하는 항체 (미국 특허 번호 5,212,290); US 5891996에 기재된 바와 같은 EGFR에 결합하는 인간화 및 키메라 항체; 및 EGFR에 결합하는 인간 항체, 예컨대 ABX-EGF (WO 98/50433 참조, 아브게닉스(Abgenix))를 포함한다. 항-EGFR 항체는 세포독성제와 접합되어, 면역접합체를 생성할 수 있다 (예를 들어, EP 659,439A2 참조, 머크 페이턴트 게엠베하(Merck Patent GmbH)). EGFR에 결합하는 소분자의 예는 ZD1839 또는 게피티닙 (이레사TM, 아스트라 제네카), 에를로티닙 HCl (CP-358774, 타르세바TM, 제넨테크/OSI) 및 AG1478, AG1571 (SU 5271; 수젠)을 포함한다.

[0122] 단백질 키나제 억제제는 ErbB 수용체와 같은 티로신 키나제의 티로신 키나제 활성을 어느 정도 억제하는 티로신 키나제 억제제를 포함한다. 이러한 억제제의 예는 이전 단락에서 언급된 EGFR-표적화된 약물 뿐만 아니라 퀴나졸린, 예컨대 PD 153035, 4-(3-클로로아닐리노) 퀴나졸린, 피리도피리미딘, 피리미도피리미딘, 피롤로피리미딘,

예컨대 CGP 59326, CGP 60261 및 CGP 62706, 및 피라졸로파리미딘, 4-(페닐아미노)-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘, 쿠르쿠민 (다이페롤로일 메탄, 4,5-비스 (4-플루오로아닐리노)프탈이미드), 니트로티오펜 모이어티를 포함하는 트라이포스틴; PD-0183805 (워너-램버트(Warner-Lambert)); 안티센스 분자 (예를 들어, ErbB-코딩 핵산에 결합하는 것); 퀴녹살린 (미국 특허 번호 5,804,396); 트라이포스틴 (미국 특허 번호 5,804,396); ZD6474 (아스트라 제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게(Schering AG)); pan-ErbB 억제제, 예컨대 CI-1033 (화이자); 아피니탁 (ISIS 3521; 아이시스(Isis)/릴리(Lilly)); 이마티닙 메실레이트 (글리벡; 노파르티스); PKI 166 (노파르티스); GW2016 (글락소 스미스클라인); CI-1033 (화이자); EKB-569 (와이어쓰); 세막사닙 (수젠); ZD6474 (아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게); INC-1C11 (임클론); 또는 임의의 하기 특허 공보에서 기재된 것: WO 99/09016 (아메리칸 시아나미드(American Cyanamid)); WO 98/43960 (아메리칸 시아나미드); WO 97/38983 (워너 램버트); WO 99/06378 (워너 램버트); WO 99/06396 (워너 램버트); WO 96/30347 (화이자, 인크.); WO 96/33978 (제네카); WO 96/3397 (제네카); 및 WO 96/33980 (제네카)을 포함한다.

[0123] "항혈관신생제"는 혈관 발생을 어느 정도 차단 또는 저해하는 화합물을 나타낸다. 항혈관신생 인자는 예를 들어 혈관신생 촉진에 관여하는 성장인자 또는 성장인자 수용체에 결합하는 소분자 또는 항체일 수 있다. 특정 예에서, 본원에서 항-혈관신생 인자는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 결합하는 항체이다.

[0124] "항구토제"는 대상체에서 오심을 감소시키거나 예방하는 화합물이다. 항구토제 화합물은, 예를 들어 뉴로키닌-1 수용체 길항제, 5HT3 수용체 길항제 (예컨대, 온단세트론, 그라니세트론, 트로피세트론 및 자티세트론), GABAB 수용체 효능제, 예컨대 바클로펜, 코르티코스테로이드, 예컨대 텍사메타손, 케날로그(KENALOG)®, 아리스토코트(ARISTOCORT)® 또는 나살리드(NASALIDE)®, 항도파민제, 페노티아진 (예를 들어, 프로클로르페라진, 플루페나진, 티오리다진 및 메소리다진), 드로나비돌, 메트로클로프라미드, 돔페리돈, 할로페리돌, 시클리진, 로라제팜, 프로클로르페라진, 및 레보메프로마진을 포함한다.

[0125] 용어 "시토카인"은 또 다른 세포에 대하여 세포간 매개자로서 작용하는, 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반적 용어이다. 이러한 시토카인의 예는 립포카인, 모노카인 및 통상적인 폴리펩티드 호르몬이다. 이러한 시토카인에 포함되는 것은 성장 호르몬, 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체형성 호르몬 (LH); 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프로락チン; 태반 락토젠; 종양 괴사 인자- α 및 - β ; 물러-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-관련 웨პ티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예컨대 NGF- β ; 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예컨대 인터페론- α , - β 및 - γ ; 및 콜로니 자극 인자 (CSF), 예컨대 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터류킨 (IL), 예컨대 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자, 예컨대 TNF- α 또는 TNF- β ; 및 다른 폴리펩티드 인자(LIF 및 키트 리간드 (KL) 포함)이다. 본원에 사용된 용어 시토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 시토카인의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.

[0126] 본원에 사용된 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 종양 세포에 덜 세포독성이고, 효소에 의해 또는 가수분해에 의해 활성화되거나 전환되어 더욱 활성인 모 형태가 될 수 있는, 제약 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조한다. 예시적인 전구약물은, 보다 활성의 세포독성의 유리 약물로 전환될 수 있는, 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 웨პ티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형 전구약물, 글리코실화 전구약물, β -락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 폐녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 폐닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기 기재된 화학요법제를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0127] "리포솜"은 약물 (예컨대 본원에 개시된 항-ErbB2 항체 및 임의로는 화학요법제)을 포유동물에게 전달하는데 유용한 다양한 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 통상적으로, 리포솜의 성분들은 생체막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열되어 있다.

- [0128] 용어 "포장 삽입물"은 일반적으로 치료 제품의 시판되는 포장물 내에 통상적으로 포함되어 있으며 이러한 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 용량, 투여, 금기사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 지침서를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0129] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 필라멘트형 파지, 입자의 표면 상의 외피 단백질에 대한 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 한 가지 유용성은 무작위 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 표적 분자에 높은 친화도로 결합하는 서열에 대해 빠르고 효율적으로 분류할 수 있다는 사실에 있다. 파지 상의 웨პ티드 및 단백질 라이브러리의 디스플레이에는 특이적 결합 특성을 갖는 것에 대해 수백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 다가 파지 디스플레이 방법은 전형적으로 필라멘트형 파지의 pIII 또는 pVIII에 대한 융합을 통해 작은 무작위 웨პ티드 및 작은 단백질을 디스플레이하는데 사용된다 (문헌 [Wells and Lowman, (1992) Curr. Opin. Struct. Biol., 3:355-362], 및 여기에 인용된 참고문헌). 1가 파지 디스플레이에서, 단백질 또는 웨პ티드 라이브러리는 파지 외피 단백질 또는 그의 일부에 융합되고, 야생형 단백질의 존재하에 낮은 수준에서 발현된다. 결합력 효과는 다가 파지에 비해 감소되어, 분류가 내인성 리간드 친화도에 기초하고, DNA 조작을 간소화시키는 파지미드 벡터가 사용된다. 문헌 [Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3:205-0216 (1991)]. 파지 디스플레이에는 항체-유사 분자를 생성하기 위한 기술을 포함한다 (문헌 [Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, p627-628]; [Lee et al.]).
- [0130] "파지미드"는 박테리아 복제 기점, 예를 들어 ColE1, 및 박테리오파지의 유전자간 영역의 카페를 갖는 플라스미드 벡터이다. 파지미드는 필라멘트형 박테리오파지 및 람다형 박테리오파지를 포함하는 임의의 공지된 박테리오파지에서 사용될 수 있다. 이러한 플라스미드는 또한 일반적으로 항생제 내성에 대한 선택 마커를 함유할 것이다. 이들 벡터 내로 클로닝된 DNA 절편은 플라스미드로서 증식될 수 있다. 이들 벡터를 보유하는 세포에 파지 입자의 생성에 필요한 모든 유전자가 제공되는 경우, 플라스미드의 복제 방식이 롤링 서클 복제로 변화되어 플라스미드 DNA 및 패키지 파지 입자의 1개 가닥 카페를 생성시킨다. 파지미드는 감염성 또는 비감염성 파지 입자를 형성할 수 있다. 이러한 용어는, 유전자 융합체로서 이종 폴리펩티드 유전자에 연결된 파지 외피 단백질 유전자 또는 그의 단편을 함유하여 상기 이종 폴리펩티드가 파지 입자의 표면상에 디스플레이 되도록 하는 파지미드를 포함한다.
- [0131] 용어 "링커", "링커 단위", "단위", "가교제" 및 "가교"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 공유 결합을 포함하는 화학적 모이어티 또는 항체 또는 항체 단편을 또 다른 항체, 항체 단편, 또는 약물 모이어티에 공유 결합에 의해 부착시키는 원자의 쇄를 의미한다. 링커는 2가 라디칼, 예컨대 알킬디일, 아릴렌, 헤테로아릴렌, 모이어티, 예컨대: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, 알킬옥시의 반복 단위 (예를 들어, 폴리에틸렌옥시, PEG, 폴리메틸렌옥시) 및 알킬아미노 (예를 들어, 폴리에틸렌아미노, 제파민(Jeffamine)TM; 및 이산 에스테르 및 아미드, 예를 들어 숙시네이트, 숙신아미드, 디글리콜레이트, 말로네이트 및 카프로아미드를 포함한다. 추가의 링커 또는 가교제는 비스-말레이미도 및 비스-알킬 할라이드, 피리딜 디술피드, 비스-수은 염, 5-티오-2-니트로벤조산-매개 가교, 및 비스-티오술포네이트를 포함한다. 예시적인 시판되는 가교제는 1,4-비스(말레이미도)부탄, (1,4-비스말레이미도-2,3-디히드록시부탄), 비스(말레이미도)헥산, 비스(말레이미도)에탄, 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오)프로파온 아미도]부탄, 1,6-헥산-비스-비닐술폰, 디티오-비스말레이미도에탄, 1,8-비스-말레이미도-디에틸렌글리콜 및 1,11-비스-말레이미도-트리에틸렌글리콜을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 예에서, 호모-트리-관능성 시약은 가교제, 예를 들어 트리스[2-말레이미도에틸]아민으로서 사용될 수 있다.
- [0132] 용어 "표지"는 항체에 공유 결합에 의해 부착될 수 있고, 하기 기능을 하는 임의의 모이어티를 의미한다: (i) 검출 가능한 신호를 제공하거나; (ii) 제2 표지와 상호작용하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공되는 검출가능한 신호를 변형시켜, 예를 들어 FRET (형광 공명 에너지 전이)를 생성하거나; (iii) 항원 또는 리간드와의 상호 작용을 안정화시키거나 또는 이들과의 결합 친화도를 증가시키거나; (iv) 전하, 소수성, 외형 또는 다른 물리적 파라미터에 의해 이동성, 예를 들어 전기영동 이동성 또는 세포 투과성에 영향을 미치거나; 또는 (v) 포획 모이어티를 제공하여 리간드 친화성, 항체/항원 결합, 또는 이온 복합체화를 조정한다.
- [0133] 본원에 사용된 입체화학적 정의 및 규정은 일반적으로 문헌 [S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York]; 및 [Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York]에 따른다. 많은 유기 화합물들은 광학 활성 형태로 존재하며, 즉, 이들은 평면-편광의 평면을 회전시키는 능력을 갖는다. 광학 활성 화합물을 기재하는데 있어서, 접두어 D 및 L, 또는 R 및 S는 키랄 중심(들)에 대한 분자의 절대 배위를 나타내

는데 사용된다. 접두어 d 및 l, 또는 (+) 및 (-)는 화합물에 의한 평면-편광 회전의 표시를 나타내는데 사용되며, (-) 또는 l은 화합물이 좌선성임을 의미한다. (+) 또는 d의 접두어가 사용되는 화합물은 우선성이다. 주어진 화학 구조에 있어서, 이러한 입체이성질체는 이들이 서로의 거울상이라는 점을 제외하고는 동일하다. 특정 입체이성질체가 거울상이성질체라 지칭될 수도 있으며, 이러한 이성질체들의 혼합물은 종종 거울상이성질체 혼합물이라 불린다. 거울상이성질체들의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체라고 지칭되며, 이것은 화학 반응 또는 방법에서 입체선택성 또는 입체특이성이 없는 경우에 생성될 수 있다. 용어 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학 활성이 없는, 2개의 거울상이성질체 종의 등몰 혼합물을 나타낸다.

[0134] 본원에 사용된 어구 "제약상 허용되는 염"은 제약상 허용되는 유기 또는 무기 염을 나타낸다. 예시적인 염은 술페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 니트레이트, 비술페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레이트, 탄네이트, 판토테네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레이트, 젠티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄솔포네이트, 에탄솔포네이트, 벤젠솔포네이트, p-톨루엔솔포네이트 및 파모에이트 (즉 1,1'-메틸렌-비스-(2-히드록시-3-나프토에이트)) 염을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 제약상 허용되는 염은 또 다른 분자, 예컨대 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 다른 반대이온의 내포를 포함할 수 있다. 반대이온은 모 화합물상의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 추가로, 제약상 허용되는 염은 그의 구조 내에 1개 초과의 대전된 원자를 가질 수 있다. 여러 개의 대전된 원자가 제약상 허용되는 염의 일부인 경우에는 여러 개의 반대이온을 가질 수 있다. 따라서, 제약상 허용되는 염은 하나 이상의 대전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대이온을 가질 수 있다.

[0135] "제약상 허용되는 용매화물"은 하나 이상의 용매 분자 및 항체의 회합체를 나타낸다. 제약상 허용되는 용매화물을 형성하는 용매의 예는 물, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸 아세테이트, 아세트산 및 에탄올아민을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0136] 하기 약어가 본원에 사용되고, 나타낸 정의를 갖는다: BME는 베타-메르캅토에탄올이고, Boc는 N-(t-부톡시카르보닐)이고, cit는 시트룰린 (2-아미노-5-우레이도 펜탄산)이고, dap는 돌라프로인이고, DCC는 1,3-디시클로헥실 카르보디이미드이고, DCM은 디클로로메탄이고, DEA는 디에틸아민이고, DEAD는 디에틸아조디카르복실레이트이고, DEPC는 디에틸포스포릴시아니데이트이고, DIAD는 디이소프로필아조디카르복실레이트이고, DIEA는 N,N-디이소프로필에틸아민이고, diI은 돌라이소류신이고, DMA는 디메틸아세트아미드이고, DMAP는 4-디메틸아미노페리딘이고, DME는 에틸렌글리콜 디메틸 에테르 (또는 1,2-디메톡시에탄)이고, DMF는 N,N-디메틸포름아미드이고, DMSO는 디메틸솔푸시드이고, doe는 돌라페닌이고, dov는 N,N-디메틸발린이고, DTNB는 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)이고, DTPA는 디에틸렌트리아민펜타아세트산이고, DTT는 디티오프레이톨이고, EDCI는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 히드로클로라이드이고, EEDQ는 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린이고, ES-MS는 전기분무 질량 분광측정법이고, EtOAc는 에틸 아세테이트이고, Fmoc는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)이고, gly는 글리신이고, HATU는 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트이고, HOEt는 1-히드록시벤조트리아졸이고, HPLC는 고압 액체 크로마토그래피이고, ile는 이소류신이고, lys는 리신이고, MeCN(CH₃CN)은 아세토니트릴이고, MeOH는 메탄올이고, Mtr은 4-아니실디페닐메틸 (또는 4-메톡시 트리틸)이고, nor은 (1S,2R)-(+)-노르에페드린이고, PAB는 p-아미노벤질카르바모일이고, PBS는 포스페이트-완충 염수 (pH 7)이고, PEG는 폴리에틸렌 글리콜이고, Ph는 페닐이고, Pnp는 p-니트로페닐이고, MC는 6-말레이미도카프로일이고, phe는 L-페닐알라닌이고, PyBrop는 브로모 트리스-피롤리디노 포스포늄 헥사플루오로포스페이트이고, SEC는 크기-배체 크로마토그래피이고, Su는 숙신이미드이고, TFA는 트리플루오로아세트산이고, TLC는 박층 크로마토그래피이고, UV는 자외선이고, val은 발린이다.

[0137] "대상체"는 척추동물, 예를 들어 포유동물 (예를 들어, 인간)이다. 포유동물은 가축 (예컨대, 소), 스포츠 동물, 애완동물 (예컨대, 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스, 및 래트를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0138] 달리 나타내지 않는 한, 본 실시예에서 언급되는 시판 시약은 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. ATCC 승인 번호에 의해 하기 실시예 및 본 명세서 전반에 걸쳐 확인된 세포의 공급원은 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection, 버지니아주 매나사스)이다. 달리 언급되지 않는 한, 본 발명은 본원에서 상기 및 하기 문헌에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 기술의 표준 절차를 이용하였다: 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]; [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989)]; [Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications

(Academic Press, Inc., NY, 1990)]; [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988)]; [Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press, Oxford, 1984)]; [Freshney, Animal Cell Culture, 1987]; [Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991].

[0139] 본 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐, "포함하다" 또는 파생어, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"이라는 단어는 언급한 정수 또는 정수 군을 포함하기는 하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수 군은 배제시키지 않는다는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0140] 다양한 추가의 용어는 규정되거나 또는 본원에서 달리 특성화된다.

[0141] 조성물 및 방법

[0142] 다중특이적 항체 및 항체 유사체

[0143] 본원에 기재된 바와 같은 다중특이적 항체 (이중특이적 항체 포함), 및 항체 유사체를 구축하기 위해, 적어도 하나의 유리 슬프히드릴 기를 갖는 항체 단편을 수득한다. 항체 단편은 시스테인 조작된 항체를 포함하는 상기 정의된 바와 같은 모 항체로부터 수득할 수 있다. 모 항체를 효소에 의해 소화시켜 항체 단편을 생성할 수 있다. 예시적인 효소에 의한 소화 방법은 펩신, 파파인 및 Lys-C를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예시적인 항체 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디아바디 (Db); 텐덤 디아바디 (taDb), 선형 항체 (미국 특허 번호 5,641,870, 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]); 1-아암 항체, 단일 가변 도메인 항체, 미니바디 (문헌 [Olafsen et al. (2004) Protein Eng. Design & Sel. 17(4):315-323]), 단일-쇄 항체 분자, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타입 (항-Id) 항체, CDR (상보성 결정 영역), 및 에피토프-결합 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 항체 단편은 또한 상기 항체 단편을 코딩하는 DNA 단편으로서 플라스미드 발현 벡터 또는 파지미드 벡터로 클로닝하여 이. 클라이에서 직접 발현시킬 수 있다. 효소에 의한 항체 소화 방법, DNA 클로닝 및 재조합 단백질 발현 방법은 당업자에게 주지되어 있고, 예시적인 방법이 본원에 제공된다.

[0144] 항체 단편은 통상적인 기술을 이용하여 정제할 수 있고, 이를 환원시켜 유리 티올 기를 생성한다. 유리 티올 기를 갖는 항체 단편은 가교제, 예를 들어 비스-말레이미드와 반응시킨다. 이러한 가교된 항체 단편을 정제한 후에 유리 티올 기를 갖는 제2 항체 단편과 반응시킨다. 2개의 항체 단편이 가교된 최종 생성물을 정제한다. 특정 실시양태에서, 각각의 항체 단편은 Fab이고, 2개의 Fab가 비스-말레이미드를 통해 연결된 최종 생성물은 본원에서 비스말레이미도-(티오-Fab)₂, 또는 비스-Fab로 지칭된다.

[0145] 이러한 다중특이적 항체 및 항체 유사체 (비스-Fab 포함)는 다수의 항체 단편 조합, 또는 천연 항체 또는 특정 항체 단편 조합의 구조적 변이체를 신속하게 합성하고, 이들을 생물학적 검정에서 원하는 활성에 대해 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

[0146] 시스테인 조작된 항체

[0147] 시스테인 조작된 항체는 이전에 기재되었다. 미국 특허 공보 번호 2007/0092940 및 문헌 [Junutula, J. R., et al., J Immunol Methods 332(1-2):41-52 (2008)]. 시스테인 조작된 항체는 모 항체일 수 있다. 이들은 특정 위치, 전형적으로 불변 영역, 예를 들어 C₁ 또는 C_{H1}에서 유리 시스테인을 갖는 항체 단편을 생성하는데 유용하다. 시스테인을 함유하도록 조작된 항체 단편은 본원에서 "티오Mab"으로 지칭되고, 이러한 시스테인 조작된 항체로부터 생성된 Fab 단편은 생성 방법과 관계없이 "티오Fab"으로 지칭된다. 이전에 기재된 바와 같이 (미국 특허 공보 번호 2007/0092940 및 문헌 [Junutula, J. R., et al., J Immunol Methods 332(1-2):41-52 [2008]]), 교체된 ("조작된") 시스테인 (Cys) 잔기를 갖는 돌연변이체를 새로 도입된, 조작된 시스테인 티올 기의 반응성에 대해 평가한다. 티올 반응성 값은 0 내지 1.0 범위의 상대적인 수치 간격이고, 임의의 시스테인 조작된 항체에 대해 측정할 수 있다. 반응성 티올 기를 갖는 것 이외에, 티오Mab는 이들이 항원 결합 능력을 보유하도록 선택되어야 한다. 시스테인 조작된 항체의 설계, 선택 및 제조는 이전에 상세하게 기재되었다. 미국 특허 공보 번호 2007/0092940 및 문헌 [Junutula, J. R., et al., J Immunol Methods 332(1-2):41-52 (2008)].

[0148] 이러한 시스테인 조작된 항체의 특정 예시적인 경쇄 (LC) 및 중쇄 (HC)의 아미노산 서열 및 상응하는 야생형 서열을 아래 열거한다 (조작된 시스테인의 위치는 진한 이탤릭체 및 밑줄 표시함). 조작된 시스테인은 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역에 도입되기 때문에, 시스테인을 이들 규정된 항체로 도입하기 위해 아래 제공된 위치는 이들 불변 영역 또는 실질적으로 유사한 불변 영역을 함유하는 임의의 항체에 대해 사용될 수 있는 것으로 이해된다.

1. HercLC(야생형)(서열 1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPS

RFSGSRSQGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVD
FPP

SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLT

LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

1. HercLC^{110Cys}(서열 2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPS

RFSGSRSQGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIKRTCAAPSVD
FPP

SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLT

LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

2. HercLC^{205Cys}(서열 3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPS

RFSGSRSQGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVD
FPP

SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLT

LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC

[0149]

4. HercHC(야생형)(서열 4)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEVARIYPTNGY
 TRY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLVT
 VSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPGCPAPEL
 LGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPS
 REE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5. HercHC^{118Cys}(서열 5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEVARIYPTNGY
 TRY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLVT
CSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPGCPAPEL
 LGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPS
 REE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0150]

6. 2C4LC(야생형)(서열 6)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRTG
 VPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

7. 2C4LC^{110Cys}(서열 7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRTG
 VPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTCAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

8. 2C4HC (VH-CH1) (야생형)(서열 8)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWVRQAPGKLEWWADVNPNSGG
 SIYNQRFKRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSPFYFDYWGQGTL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

9. 5A6HC (VH-CH1) (야생형)(서열 9)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVCASGFTFSDAWMDWVRQSPERGLEWVAEIRSKPNN
 HATYYAESVKRFTISRDDSKSSVYLQMTSLRPEDTGIIYYCTHFDYWGQGTTLVSS
 AKTTGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPABL
 QSSGLYSLSSVTVPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

10. 5A6HC^{121C}(서열 10)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVCASGFTFSDAWMDWVRQSPERGLEWVAEIRSKPNN
 HATYYAESVKRFTISRDDSKSSVYLQMTSLRPEDTGIIYYCTHFDYWGQGTTLVSS
CAKTTGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPABL
 QSSGLYSLSSVTVPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

11. 5A6LC (야생형)(서열 11)

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEIISGYLSWFQQKPDGTIKRLIYAASALDSG
 VPKRFSGSGSDYSLTISSLESEDFADEYYCLQYVSYPLTFGAGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

12. 5A6LC^{110Cys}(서열 12)

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEIISGYLSWFQQKPDGTIKRLIYAASALDSG
 VPKRFSGSGSDYSLTISSLESEDFADEYYCLQYVSYPLTFGAGTKVEIKRTCAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSTTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

13. 22E7HC (VH-CH1) (야생형)(서열 13)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSKAASGFTFSSYGMSWVRQTPEKRLEWVATISGGNNY
TFYPDNLKGRFTISRDNAKNILYQISSLRSVDTALYYCASLWYRASFAYWGQGTLV
TVSSAKTTGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

14. 22E7HC^{121C}(서열 14)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSKAASGFTFSSYGMSWVRQTPEKRLEWVATISGGNNY
TFYPDNLKGRFTISRDNAKNILYQISSLRSVDTALYYCASLWYRASFAYWGQGTLV
TVSSCKTGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

15. 22E7LC (야생형)(서열 15)

DIMMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLISRANRLVDG
VPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFFFTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSTTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

16. 22E7LC^{110Cys}(서열 16)

DIMMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLISRANRLVDG
VPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFFFTFGGGTKVEIKRTCAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSTTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

17. D1-5HC (VH-CH1) (야생형)(서열 17)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTGNWIHWVRQAPGKGLEWVGEISPSSGY
TDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSYEAAMDYWGQG
TLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGV
HTPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

18. D1-5LC (야생형)(서열 18)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLIYSASFLYSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYPTFGQGTTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSTTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

19. D1-5LC^{110Cys}(서열 19)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYPTPYTFGQGKVEIKRT**CAAPS**
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

20. C3-101HC (VH-CH1) (야생형)(서열 20)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVGTINPYSGA
 TDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLAVGVFANRYFDYWGQ
 GTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWNNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

21. C3-101LC(야생형)(서열 21)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTPRTFGQGKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

22. C3-101LC^{110Cys}(서열 22)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTPRTFGQGKVEIKRT**CAAPS**
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

[0153]

[0154]

시스테인 조작된 항체는 이들의 야생형, 모 항체 대응물의 항원 결합 능력을 보유하는 것이 선택되기 때문에, 이들은 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 항원은 예를 들어 종양-관련 항원 (TAA), 세포 표면 수용체 단백질 및 다른 세포 표면 분자, 막횡단 단백질, 신호전달 단백질, 세포 생존 조절 인자, 세포 증식 조절 인자, 조직 발생 또는 분화와 관련된 분자 (예를 들어, 조직 발생 또는 분화에 기능적으로 기여하는 것으로 공지되거나 또는 의심되는 것), 림포카인, 시토카인, 세포 주기 조절에 관여하는 분자, 혈관형성에 관여하는 분자 및 혈관신생과 관련된 분자 (예를 들어, 혈관신생에 기능적으로 기여하는 것으로 공지되거나 또는 의심되는 것)를 포함한다. 종양-관련 항원은 클러스터 분화 인자 (즉, CD 단백질)일 수 있다. 시스테인 조작된 항체가 결합할 수 있는 항원은 상기 언급된 카테고리 중 하나의 하위세트의 구성원일 수 있고, 여기서 상기 카테고리의 다른 하위세트(들)는 (관심있는 항원과 관련하여) 특징적인 특성을 갖는 다른 분자/항원을 포함한다.

[0155]

모 항체는 또한 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 (트라스투주맙, 헤르셉틴®) (명백하게 본원에 참고로 포함된, 미국 특허 번호 5,821,337의 표 3에 기재된 바와 같음); 인간화 520C9 (WO 93/21319) 및 인간화 2C4 항체로부터 선택된 인간화 항체일 수 있다.

[0156]

다관능성 다중특이적 항체 및 항체 유사체

[0157]

다중특이적 항체 및 항체 유사체는 추가의 관능성 모이어티가 다중특이적 항체 또는 항체 유사체에 부착될 수 있도록 변형된 가교체를 사용하여 합성될 수 있다. 변형된 가교체는 임의의 슬프히드릴-반응성 모이어티의 부착을 허용한다. 한 실시양태에서, N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트 (SATA)는 비스-말레이미드에 부착하여 비스-말레이미드-아세틸티오아세테이트 (BMata)를 형성한다. 차폐된 티올 기의 탈보호 후에, 슬프히드릴-반응성 (또는 티올-반응성) 모이어티를 갖는 임의의 관능기가 부착될 수 있다.

[0158]

예시적인 티올-반응성 시약은 다관능성 링커 시약, 포획, 즉 친화도, 표지 시약 (예를 들어, 비오틴-링커 시약), 검출 표지 (예를 들어, 형광단 시약), 고체 상 고정화 시약 (예를 들어, 세파로스(SEPHAROSE)TM, 폴리스티렌 또는 유리), 또는 약물-링커 중간체를 포함한다. 티올-반응성 시약의 한 가지 예는 N-에틸 말레이미드 (NEM)이다. 변형된 가교체를 갖는 이러한 다중특이적 항체 또는 항체 유사체는 약물 모이어티 시약 또는 다른 표지와 추가로 반응시킬 수 있다. 다중특이적 항체 또는 항체 유사체와 약물-링커 중간체의 반응은 각각 다중 특이적 항체 약물 접합체 또는 항체 유사체 약물 접합체를 제공한다.

[0159]

이러한 접근법은 반응성 기가, 예를 들어 말레이미드, 아이오도아세트아미드, 페리딜 디술피드, 또는 다른 티올-반응성 접합 상대인 다른 티올-반응성 작용제의 접합에 적용할 수 있다 (문헌 [Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley,

1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2]; [Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London]; [Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2]; [Hermanson, G. in *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). 상대는 세포독성제 (예를 들어, 독소, 예를 들어 독소루비신 또는 백일해 독소), 형광단, 예를 들어 플루오레세인 또는 로다민과 같은 형광 염료, 영상화 또는 방사선 요법 금속에 대한 칼레이트화제, 웨პ티딜 또는 비-웨პ티딜 표지 또는 검출 태그, 또는 제거-변형제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜의 다양한 이성질체, 제3 성분에 결합하는 웨პ티드, 또는 다른 탄수화물 또는 친유성 물질일 수 있다.

[0160] 일부민-결합 웨პ티드 (ABP) 서열 (문헌 [Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043]; WO 01/45746)은 또한 변형된 가교체를 갖는 다중특이적 항체 또는 항체 유사체와 반응할 수 있다. 예시적인 ABP 서열은 다음에 기재되어 있다: (i) 문헌 [Dennis et al. (2002) *J Biol Chem.* 277:35035-35043]의 표 III 및 IV, 페이지 35038; (ii) US 20040001827의 [0076]의 서열 9-22; 및 (iii) WO 01/45746의 페이지 12-13의 서열 z1-z14.

[0161] 돌연변이유발

[0162] 출발 폴리웨პ티드의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 DNA는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법은 폴리웨პ티드를 코딩하는 앞서 제조된 DNA의 부위-지정 (또는 올리고뉴클레오티드-매개) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 제조한 항체의 변이체는 제한 단편 조작에 의해 또는 합성 올리고뉴클레오티드를 사용한 중복 신장 PCR에 의해서도 또한 제조할 수 있다. 돌연변이유발 프라이머는 시스테인 코돈 대체물(들)을 코딩한다. 표준 돌연변이유발 기술은 이러한 돌연변이체 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 일반적인 안내는 문헌 [Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]; 및 [Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993]에서 찾아볼 수 있다.

[0163] 부위-지정 돌연변이유발은 치환 변이체, 즉 돌연변이체 단백질을 제조하기 위한 한 가지 방법이다. 이 기술은 당업계에 주지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Carter (1985) et al. *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443]; [Ho et al. (1989) *Gene* (Amst.) 77:51-59]; 및 [Kunkel et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488] 참조). 간략하게, DNA의 부위-지정 돌연변이유발을 수행하는데 있어서, 출발 DNA는 먼저 원하는 돌연변이를 코딩하는 올리고뉴클레오티드를 이러한 출발 DNA의 단일 가닥에 혼성화시킴으로써 변경된다. 혼성화 후에, 혼성화된 올리고뉴클레오티드를 프라이머로서 사용하고 출발 DNA의 단일 가닥을 주형으로서 사용하면서 DNA 폴리머라제를 사용하여 전체 제2 가닥을 합성한다. 따라서, 원하는 돌연변이를 코딩하는 올리고뉴클레오티드는 생성된 이중 가닥 DNA 내에 도입된다. 부위-지정 돌연변이유발은 발현 플라스미드에서 돌연변이유발될 단백질을 발현하는 유전자 내에서 수행될 수 있고, 생성된 플라스미드는 원하는 시스테인 대체 돌연변이의 도입을 확인하기 위해 서열분석될 수 있다 (문헌 [Liu et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:20252-20260]). 상업적으로 이용가능한 것, 예를 들어 퀵체인저(QuikChange)® 다중 부위-지정 돌연변이유발 키트 (스트라타진(Stratagene), 캘리포니아주 라 졸라)를 포함한 부위-지정 돌연변이유발 프로토콜 및 포맷이 존재한다.

[0164] PCR 돌연변이유발은 또한 출발 폴리웨პ티드의 아미노산 서열 변이체를 만드는데 적합한다. 문헌 [Higuchi, (1990) in *PCR Protocols*, pp.177-183, Academic Press]; [Ito et al. (1991) *Gene* 102:67-70]; [Bernhard et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132]; 및 [Vallette et al. (1989) *Nuc. Acids Res.* 17:723-733]을 참조한다. 간략하게, 소량의 주형 DNA를 PCR에서 출발 물질로 사용하였을 때, 주형 DNA에서 상응하는 영역으로 부터의 서열이 약간 상이한 프라이머를 사용하여, 프라이머가 주형과 상이한 위치에서만 주형 서열과 상이한 특정 DNA 단편을 비교적 대량으로 생성할 수 있다.

[0165] 변이체를 제조하기 위한 다른 방법인 카세트 돌연변이유발은 문헌 [Wells et al. (1985) *Gene* 34:315-323]에 기재된 기술을 기초로 한다. 출발 물질은 돌연변이시킬 출발 폴리웨პ티드 DNA를 포함하는 플라스미드 (또는 다른 벡터)이다. 돌연변이시킬 출발 DNA 내의 코돈(들)이 확인된다. 확인된 돌연변이 부위(들)의 각각의 측면상에 특징적인 제한 엔도뉴클레아제 부위가 존재해야 한다. 이러한 제한 부위가 존재하지 않으면, 이들을 출발 폴리웨პ티드 DNA 내의 적절한 위치에 도입하기 위해 상기 기재된 올리고뉴클레오티드-매개 돌연변이유발 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 플라스미드 DNA는 선형화를 위해 상기 부위에서 절단된다. 제한 부위 사이의 DNA의 서열을 코딩하지만 바람직한 돌연변이(들)를 함유하는 이중 가닥의 올리고뉴클레오티드는 표준 절차를 이용하여 합성되고, 여기서 올리고뉴클레오티드의 2개의 가닥은 따로 합성된 후, 표준 기술을 이용하여 함께 혼

성화된다. 상기 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 카세트로서 지칭된다. 상기 카세트는 플라스미드에 직접 라이게이션될 수 있도록 선형화된 플라스미드의 말단과 혼화성인 5' 및 3' 말단을 갖도록 설계된다. 상기 플라스미드는 이제 돌연변이된 DNA 서열을 함유한다. 코딩된 시스테인 대체를 포함하는 돌연변이체 DNA는 DNA 서열분석에서 확인될 수 있다.

[0166] 단일 돌연변이는 또한 PCR 기반 돌연변이유발에 의해 주형으로서 이중 가닥 플라스미드 DNA를 사용하는 올리고뉴클레오티드 지정 돌연변이유발에 의해서 생성된다 (문헌 [Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition]; [Zoller et al. (1983) Methods Enzymol. 100:468-500]; [Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500]).

[0167] 올리고뉴클레오티드는 포스포르아미다이트 합성 방법에 의해 제조된다 (US 4415732; US 4458066; 문헌 [Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) "Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach", Tetrahedron 48:2223-2311]). 포스포르아미다이트 방법은 반응성 3' 포스포르아미다이트 모이어티를 갖는 뉴클레오티드 단량체를 제어된-공극 유리 또는 고도로 가교된 폴리스티렌으로 구성된 고체-지지체 상에서 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄에, 가장 통상적으로는 3' 말단 뉴클레오시드가 합성 시작시에 고체-지지체 상에 부착되는 3' → 5' 방향으로 주기적으로 부가하는 것을 수반하였다 (US 5047524; US 5262530). 이 방법은 일반적으로 자동화된, 시판 합성기 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 캘리포니아주 포스터 시티)를 사용하여 시행된다. 올리고뉴클레오티드는 검출, 포획, 안정화 또는 다른 목적을 위해 비-동위원소 모이어티로 화학적으로 표지될 수 있다 (문헌 [Andrus, A. "Chemical methods for 5' non-isotopic labeling of PCR probes and primers" (1995) in PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54]; [Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]; [Keller, G. and Manak, M. in DNA Probes Second Edition (1993), Stockton Press, New York, pp. 121-23]).

[0168] 항체에서 반응성 시스테인 기의 검출은 ELISA 과지 포맷을 사용하여 수행할 수 있다 (미국 특허 공보 번호 2007/0092940 및 문헌 [Junutula, J. R., et al., J Immunol Methods 332(1-2):41-52 (2008)]에 기재된 바와 같은 PHESELECTOR [반응성 티올의 선택을 위한 과지 ELISA]).

단백질 발현 및 정제

[0170] 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브 사용)를 이용하여 쉽게 단리 및 서열분석된다. 하이브리도마 세포가 이러한 DNA의 공급원으로 기능할 수 있다. DNA가 일단 단리되면, 이것을 발현 벡터에 위치시킬 수 있고, 이어서 이것을 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 항체 단백질을 달리 생성하지는 않는 다른 포유동물 숙주 세포, 예컨대 골수종 세포 (미국 특허 번호 5,807,715; 미국 공보 번호 2005/0048572 및 2004/0229310)에 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성물을 얻을 수 있다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 검토 문헌은 문헌 [Skerra et al. (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262] 및 [Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188]을 포함한다.

[0171] 고도로 반응성인 쌍을 형성하지 않은 Cys 잔기를 갖는 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 티오Fab는 (i) 박테리아, 예를 들어 이. 콜라이, 시스템 또는 포유동물 세포 배양 시스템 (WO 01/00245), 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO)에서의 발현; 및 (ii) 통상적인 단백질 정제 기술을 사용한 정제 (문헌 [Lowman et al. (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988])에 의해 생성될 수 있다.

[0172] 예시적인 정제 절차는 다음을 포함한다: 면역 친화성 또는 이온-교환 칼럼 상의 분별 종류, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 양이온-교환 수지, 예컨대 DEAE 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어 세파넥스 G-75를 사용하는 젤 여과.

[0173] 한 측면에서, 고체상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 전장 항체 생성물의 면역친화성 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고 친화도로 결합하는 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다. 문헌 [Lindmark et al., (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어된 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼일 수 있다. 일부 용도에서, 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅하여 가능하게는 오염물의 비특이적 부착을 방지한다.

- [0174] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양물로부터의 제조는 단백질 A의 관심있는 항체의 특이적 결합을 허용하기 위해 단백질 A 고정된 고체 상에 적용된다. 이어서, 고체 상을 세척하여 고체 상이 비특이적으로 결합된 오염물을 제거한다. 관심있는 항체는 카오토로프제 또는 온화한 세제를 함유하는 용액으로의 용리에 의해 고체 상으로부터 회수할 수 있다. 예시적인 카오토로프제 및 온화한 세제는 구아니딘-HCl, 우레아, 리튬 피클로레이트, 아르기닌, 히스티딘, SDS (나트륨 도데실 술페이트), 트윈, 트리톤 및 NP-40을 포함하나 이에 제한되지 않고, 이들은 모두 시판되는 것이다. 항체를 칼럼 (예를 들어, mAbSure 칼럼)으로부터 용리한 후에 카오토로프제 또는 온화한 세제를 함유하는 용액에 희석하는 것은 용리한 후 항체의 안정성을 유지시키고, 본원에 기재된 바와 같은 추가의 조작을 허용한다.
- [0175] 표지된 다중특이적 항체 및 항체 유사체
- [0176] 본 발명의 다중특이적 항체 및 항체 유사체, 특히 유리 술프히드릴 기를 갖는 변형된 가교체로 합성된 것은 반응성 시스테인 티올 기를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착될 수 있는 임의의 표지 모이어티와 접합될 수 있다 (문헌 [Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-15]; [Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]; [Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL]). 부착된 표지는 (i) 검출 가능한 신호를 제공하거나; (ii) 제2 표지와 상호작용하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공되는 검출 가능한 신호를 변형시켜, 예를 들어 FRET (형광 공명 에너지 전이)를 생성하거나; (iii) 항원 또는 리간드와의 상호 작용을 안정화시키거나 또는 이들과의 결합 친화도를 증가시키거나; (iv) 전하, 소수성, 외형 또는 다른 물리적 파라미터에 의해 이동성, 예를 들어 전기영동 이동성 또는 세포 투과성에 영향을 미치거나; 또는 (v) 포획 모이어티를 제공하여 리간드 친화성, 항체/항원 결합, 또는 이온 복합체화를 조정하는 기능을 할 수 있다.
- [0177] 표지된 다중특이적 항체는, 예를 들어 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서 관심있는 항원의 발현을 검출하기 위한 진단 검정에서 유용할 수 있다. 진단 용도를 위해, 항체는 전형적으로 검출 가능한 모이어티로 표지될 것이다. 수많은 표지가 이용가능하고, 이들은 일반적으로 하기 카테고리로 분류될 수 있다.
- [0178] (a) 방사성동위원소 (방사성핵종), 예컨대 ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At , 또는 ^{213}Bi . 방사성동위원소 표지된 항체는 수용체 표적화된 영상화 실험에 유용하다. 항체는 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)]에 기재된 기술을 이용하여, 방사성동위원소 금속에 결합하거나 킬레이트화되거나 또는 상이한 방식으로 복합체화하여 항체의 조작된 시스테인 티올과 반응성인 리간드 시약으로 표지될 수 있다. 금속 이온과 복합체를 형성할 수 있는 킬레이팅 리간드로는 DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA 및 TETA (마크로시클릭스 (Macrocyclics), 텍사스주 달라스) 등이 있다. 방사성핵종은 본 발명의 항체-약물 접합체와의 복합체 형성을 통해 표적화될 수 있다 (문헌 [Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146]).
- [0179] 영상화 실험을 위한 항체 표지로서 적합한 금속-킬레이트 복합체가 다음 문헌에 개시되어 있다: 미국 특허 번호 5,342,606; 5,428,155; 5,316,757; 5,480,990; 5,462,725; 5,428,139; 5,385,893; 5,739,294; 5,750,660; 5,834,456; 문헌 [Hnatowich et al. (1983) J. Immunol. Methods 65:147-157]; [Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142:68-78]; [Mirzadeh et al. (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65]; [Meares et al. (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26]; [Izard et al. (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350]; [Nikula et al. (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90]; [Camera et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62]; [Kukis et al. (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110]; [Verel et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670]; [Camera et al. (1994) J. Nucl. Med. 21:640-646]; [Ruegg et al. (1990) Cancer Res. 50:4221-4226]; [Verel et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670]; [Lee et al. (2001) Cancer Res. 61:4474-4482]; [Mitchell, et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112]; [Kobayashi et al. (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111]; [Miederer et al. (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137]; [DeNardo et al. (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90]; [Blend et al. (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363]; [Nikula et al. (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76]; [Kobayashi et al. (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36]; [Mardirossian et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74]; [Roselli et al. (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20].
- [0180] (b) 형광 표지, 예를 들어 희토류 킬레이트 (유로퓸 킬레이트), FITC, 5-카르복시플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인을 포함하는 플루오레세인 유형, TAMRA를 포함하는 로다민 유형; 단실; 리사민(Lissamine); 시아닌; 피

코에리트린; 텍사스 레드(Texas Red) 및 이들의 유사체가 있다. 형광 표지는 예를 들어 문헌 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌]에 개시된 기술을 이용하여 항체에 접합될 수 있다. 형광 염료 및 형광 표지 시약은 인비트로젠(Invitrogen)/몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes, 오레곤주 유진) 및 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (Pierce Biotechnology, Inc., 일리노이주 록포드)에서 시판하는 것을 포함한다.

[0181] (c) 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하거나 문헌에 개시되어 있다 (미국 특허 번호 4,275,149). 효소는 일반적으로 다양한 기술을 이용하여 측정할 수 있는 발색 기질의 화학적 변경을 측매한다. 예를 들어, 효소는 기질에서의 색상 변화를 측매할 수 있고, 이는 분광학적으로 측정할 수 있다. 대안적으로, 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변경시킬 수 있다. 형광의 변화를 정량하는 기술은 상기 기재되어 있다. 화학발광 기질은 화학적 반응에 의해 전자적으로 여기된 후에 측정 (예를 들어, 화학발광계 사용)할 수 있는 광을 방출하거나 에너지를 형광 수용자에게 제공할 수 있다. 효소 표지의 예는 루시페라제 (예를 들어, 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제, US 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 데히드로제나제, 우레아제, 퍼옥시다제, 예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제 (AP), β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제 (예를 들어, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로제나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예를 들어, 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다. 효소를 항체에 접합시키는 기술은 문헌 [O'Sullivan et al. (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166]에 기재되어 있다.

[0182] 효소-기질 조합의 예는 예를 들어 다음을 포함한다:

[0183] (i) 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 기질로서의 수소 퍼옥시다제 (여기서, 수소 퍼옥시다제는 염료 전구체 (예를 들어, 오르토페닐렌 디아민 (OPD) 또는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 히드로클로라이드 (TMB))를 산화시킴),

[0184] (ii) 알칼리성 포스파타제 (AP)와 발색 기질로서의 파라-니트로페닐 포스페이트, 및

[0185] (iii) β -D-갈락토시다제 (β -D-Gal)와 발색 기질 (예를 들어, p-니트로페닐- β -D-갈락토시다제) 또는 형광발생 기질 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토시다제의 조합물.

[0186] 수많은 상이한 효소-기질 조합이 당업자에게 이용가능하다. 이들의 일반적인 검토를 위해서, 미국 특허 번호 4,275,149 및 4,318,980을 참조한다.

[0187] 표지는 간접적으로 다중특이적 항체 또는 항체 유사체와 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체를 비오틴과 접합시키고, 상기 언급한 표지의 3가지 광범위한 카테고리 중 임의의 표지를 아비딘 또는 스트렙타비딘과 접합시킬 수도 있고, 또는 그 반대로 접합시킬 수도 있다. 비오틴은 스트렙타비딘에 선택적으로 결합하기 때문에, 표지가 이러한 간접적인 방식으로 항체와 접합될 수 있다. 대안적으로, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시키기 위해서, 폴리펩티드 변이체는 작은 합텐 (예를 들어, 디옥신)과 접합시키고 상기 언급한 여러 유형의 표지 중 하나를 항-합텐 폴리펩티드 변이체 (예를 들어, 항-디옥신 항체)와 접합시킨다. 이에 따라, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시킬 수 있다 (문헌 [Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego]).

[0188] 이러한 표지된 다중특이적 항체 또는 표지된 항체 유사체는 임의의 공지된 검정 방법, 예컨대 ELISA, 경쟁적 결합 검정, 직접 및 간접 샌드위치 검정 및 면역침전 검정에 사용될 수 있다 (문헌 [Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.]).

[0189] 검출 표지는 결합 또는 인식 사건을 국소화하고 시각화하며 정량하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 표지된 다중특이적 항체 및 표지된 항체 유사체는 세포-표면 수용체를 검출할 수 있다. 검출 가능하게 표지된 항체에 대한 또 다른 용도는 비드를 형광성 표지된 항체와 접합시키고, 리간드의 결합시 형광 신호를 검출하는 것을 포함하는, 비드에 의거한 면역포획 방법이다. 유사한 결합 검출 방법은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 효과를 이용하여 항체-항원 상호작용을 측정하고 검출한다.

[0190] 검출 표지, 예를 들어 형광 염료 및 화학발광 염료 (문헌 [Briggs et al. (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058])는 검출가능한 신호를 제공하고, 일반적으로, 전형적으로 하기 특성을 갖고 항체 표지에 적용할 수 있다: (i) 표지된 항체는 낮은 배경으로 매우 높은 신호를 생성하여 소량의 항체가 세포-비함유 분석 및 세포-기반 검정 둘 다에서 민감하게 검출될 수 있도록 해야 하고, (ii) 표지된 항체는 광안정성이어서 형광 신호가 유의한 광표백 없이 관찰되고 모니터링되며 기록될 수 있어야 한다. 표지된 항체를 특히 살아있는 세포

의 막 또는 세포 표면에 세포 표면 결합시키는 것을 포함하는 적용을 위해서는, 표지가 전형적으로 (iii) 효과적인 접합체 농도 및 검출 감수성 달성을 위해 양호한 수용성을 보유하고, (iv) 세포의 정상적인 대사 과정을 파괴하거나 조기 세포 사멸을 초래하지 않도록 살아있는 세포에 비독성인 것이 바람직하다.

[0191] 세포 형광 강도의 직접 정량 및 형광 표지 사건의 확인, 예를 들어 펩티드-염료 접합체의 세포 표면 결합은 살아있는 세포 또는 비드와의 혼합/해독, 비-방사성 검정을 자동화한 시스템 (FMA[®] 8100 HTS 시스템, 어플라이드 바이오시스템즈, 캘리포니아 포스터 시티))에서 수행될 수 있다 (문헌 [Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204]). 표지된 항체의 용도는 또한 세포 표면 수용체 결합 검정, 면역포획 검정, 형광 연결된 면역흡착 검정 (FLISA), 카스파제-절단 (문헌 [Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23]; US 6372907), 아폽토시스 (문헌 [Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51]) 및 세포독성 분석을 포함한다. 형광 마이크로부피 분석 기술은, 세포 표면에 표적화된 분자에 의한 상향 또는 하향 조절을 확인하는데 이용될 수 있다 (문헌 [Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51]).

[0192] 본 발명의 표지된 다중특이적 항체 및 표지된 항체 유사체는 생체의학적 영상화와 분자 영상화의 다양한 방법 및 기술, 예컨대 (i) MRI (자기 공명 영상화), (ii) 마이크로CT (컴퓨터 단층촬영), (iii) SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영), (iv) PET (양전자 방출 단층촬영) (문헌 [Chen et al. (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49]), (v) 생체발광, (vi) 형광, 및 (vii) 초음파에 의한 영상화 바이오마커 및 프로브로서 유용하다. 면역섬광조영술은 방사성 물질로 표지된 항체를 동물 또는 인간 환자에게 투여하고 항체가 위치하는 신체 부위의 사진을 찍는 영상화 절차이다 (US 6528624). 영상화 바이오마커는 객관적으로 측정되어 정상적인 생물학적 과정, 발병 과정 또는 치료 개입에 대한 약리학적 반응의 지시자로서 평가될 수 있다. 생물마커는 여러가지 유형일 수 있다: 유형 0은 질환의 본래 병력 마커이며, 공지된 임상 지표, 예를 들어 류마티스 관절염에서 활액 염증의 MRI 평가와 장기적으로 상관관계가 있고; 유형 I 마커는 작용 메카니즘이 임상 결과와 관련되지 않을 수 있는 경우에도 이 작용 메카니즘에 따른 개입 효과를 보여주며; 유형 II 마커는 대리 종말점으로서 기능하여, 바이오마커의 변화 또는 바이오마커로부터의 신호가 표적화된 반응의 "유효성", 예를 들어 류마티스 관절염에서 CT에 의한 골 침식 측정치에 대한 임상적 이점을 예측한다. 따라서, 영상화 바이오마커는 (i) 표적 단백질의 발현, (ii) 표적 단백질에 대한 치료제의 결합, 즉 선택성, 및 (iii) 제거율 및 반감기 약력학 데이터에 대한 약동학 (PD) 치료 정보를 제공할 수 있다. 실험에 기초한 바이오마커에 비한 생체내 영상화 바이오마커의 이점은 비-침습성 치료, 정량 가능한 전신 평가, 반복적 투여 및 평가, 즉 여러 시점에서의 투여 및 평가, 및 전임상 결과 (작은 동물)로부터 임상 (인간) 결과로의 잠재적으로 전이 가능한 효과를 포함한다. 몇몇 용도의 경우, 생체영상화는 전임상 연구에서의 동물 실험을 대체하거나 그 횟수를 최소화한다.

[0193] 방사성핵종 영상화 표지는 방사성핵종, 예컨대 ³H, ¹¹C, ¹⁴C, ¹⁸F, ³²P, ³⁵S, ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ⁸⁶Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹³³Xe, ¹⁷⁷Lu, ²¹¹At, 또는 ²¹³Bi를 포함한다. 방사성핵종 금속 이온은 퀼레이트화 링커, 예컨대 DOTA와 복합체화될 수 있다. 링커 시약, 예컨대 DOTA-말레이이미드 (4-말레이이미도부티르아미도벤질-DOTA)는 문헌 [Axworthy et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807]의 절차에 따라 아미노벤질-DOTA를 이 소프로필클로로포르메이트 (알드리치 (Aldrich))로 활성화시킨 4-말레이이미도부티르산 (플루카 (Fluka))과 반응시켜 제조할 수 있다. DOTA-말레이이미드 시약은 본 발명의 다중특이적 항체 또는 항체 유사체의 변형된 가교제의 유리 슬프히드릴과 반응하여 항체 상에 금속 착물 형성 리간드를 제공한다 (문헌 [Lewis et al. (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86]). 퀼레이트화 링커 표지 시약, 예컨대 DOTA-NHS (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노 (N-히드록시숙신이미드 에스테르)는 시판된다 (마크로시클러스, 텍사스주 달라스). 방사성핵종 표지된 항체를 사용한 수용체 표적 영상화는 종양 조직 중 항체의 점진적인 축적을 검출 및 정량함으로써 경로 활성화의 마커를 제공할 수 있다 (문헌 [Albert et al. (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210]). 접합된 방사성-금속은 리소솜 분해 후 세포 내에 남아 있을 수 있다.

[0194] 펩티드 표지 방법을 주지되어 있다. 문헌 [Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2]; [Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London]; [Means

(1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2]; [Glazer et al. (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York]; [Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York]; [Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York]; 및 [Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); [De Leon-Rodriguez et al. (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155]; [Lewis et al. (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324]; [Li et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115]; [Mier et al. (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237]을 참조한다.

[0195] 2개의 모이어티, 즉 형광성 리포터 및 켄처로 충분히 근접하여 표지시킨 웨პ티드 및 단백질은 형광 공명 에너지 전이 (FRET)를 진행한다. 리포터 기는 대체로 특정 파장의 광에 의해 여기되고 최대 밝기에서 방출될 수 있는 적절한 스톡스(Stokes) 이동으로 에너지를 수용자 또는 켄처 기에게 전달하는 형광 염료이다. 형광 염료에는 연장된 방향성 (확장된 방향족성)을 갖는 분자, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 이들의 유도체 등이 있다. 형광 리포터는 무손상 웨პ티드 중의 켄처 모이어티에 의해 부분적으로 또는 유의하게 켄칭될 수 있다. 웨პ티드를 웨პ티다제 또는 프로테아제에 의해 절단시키면, 검출가능한 수준으로 형광 상의 증가가 측정될 수 있다 (문헌 [Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34]).

[0196] 본 발명의 표지된 다중특이적 항체 및 표지된 항체 유사체는 친화도 정제제로서 사용될 수도 있다. 이러한 과정에서는, 당업계에 주지된 방법을 사용하여 표지된 항체를 고체 상, 예를 들어 세파텍스 수지 또는 필터지 상에 고정화시킨다. 고정된 항체를 정제될 항원을 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 지지체를 정제될 항원을 제외하고는 샘플 중에 존재하는 실질적으로 모든 물질을 제거할 적합한 용매로 세척하는데, 상기 항원은 고정된 폴리웨პ티드 변이체에 결합한다. 최종적으로, 상기 지지체를 폴리웨პ티드 변이체로부터 항원을 방출시킬 또 다른 적합한 용매, 예를 들어 글리신 완충액 (pH 5.0)으로 세척하였다.

[0197] 표지 시약은 전형적으로 (i) 변형된 가교체의 유리 슬리프히드릴과 직접적으로 반응하여 표지된 다중특이적 항체 또는 표지된 항체 유사체를 형성할 수 있거나, (ii) 링커 항체와 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있는 반응성 관능기를 보유한다. 표지 시약의 반응성 관능기는 말레이이미드, 할로아세틸, 아이오도아세트아미드 숙신이미딜 에스테르 (예를 들어, NHS, N-히드록시숙신이미드), 이소티오시아네이트, 술포닐 클로라이드, 2,6-디클로로트리아지닐, 펜타플루오로페닐 에스테르를 포함하나, 다른 관능기도 사용될 수 있다.

[0198] 예시적인 반응성 관능기는 검출가능한 표지, 예를 들어 비오틴 또는 형광 염료의 카르복실 기 치환기의 N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (NHS)이다. 표지의 NHS 에스테르는 예비 형성, 단리, 정제 및/또는 특성화될 수 있거나, 또는 계내 형성되어 항체의 친핵성 기와 반응할 수 있다. 전형적으로, 카르복실 형태의 표지는 카보디이미드 시약, 예를 들어 디시클로헥실카보디이미드, 디이소프로필카보디이미드, 또는 우로늄 시약, 예를 들어 TSTU (0-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트, HBTU (0-벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 혼사플루오로포스페이트), 또는 HATU (0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 혼사플루오로포스페이트), 활성화제, 예컨대 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBt), 및 표지의 NHS 에스테를 제공하기 위한 N-히드록시숙신이미드의 몇몇 조합물과 반응시킴으로써 활성화시킨다. 몇몇 경우에는, 표지 및 항체가 표지의 계내 활성화 및 항체와의 반응으로 커플링되어 표지-항체 접합체를 한 단계로 형성할 수 있다. 다른 활성화 및 커플링 시약은 TBTU (2-(1H-벤조트리아조-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 혼사플루오로포스페이트), TFFH (N,N',N",N'"-테트라메틸우로늄 2-플루오로-헥사플루오로포스페이트), PyBOP (벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 혼사플루오로포스페이트), EEDQ (2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린), DCC (디시클로헥실카보디이미드); DIPCDI (디이소프로필카보디이미드), MSNT (1-(메시틸렌-2-술포닐)-3-니트로-1H-1,2,4-트리아졸, 및 아릴 술포닐 할라이드, 예를 들어 트리이소프로필벤젠 술포닐 클로라이드를 포함한다.

[0199] 알부민 결합 웨პ티드 (ABP)-함유 다중특이적 항체 및 항체 유사체

[0200] 혈장-단백질 결합은 단기 생존 분자의 약동학 특성을 개선시키는 효과적인 수단일 수 있다. 알부민은 혈장에서 가장 풍부한 단백질이다. 혈장 알부민 결합 웨პ티드 (ABP)는 조직 흡수, 침투 및 확산의 변경을 포함하여, 융합된 활성 도메인 단백질의 약동학을 변경시킬 수 있다. 이들 약동학 파라미터는 적절한 혈청 알부민 결합 웨პ티드 서열의 특이적 선택에 의해 조정될 수 있다 (미국 특허 공보 번호 20040001827). 일련의 알부민 결합 웨პ티드

드를 파지 디스플레이 스크리닝에 의해 확인하였다 (문헌 [Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043]; WO 01/45746). 본 발명의 화합물은 (i) 문헌 [Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043]의 표 III 및 표 IV, 페이지 35038, (ii) US 20040001827의 [0076]의 서열 9-22, 및 (iii) WO 01/45746의 페이지 12-13의 서열 z1-z14에 교시된 ABP 서열을 포함한다.

[0201] 알부민 결합 (ABP)-함유 다중특이적 항체는 유리 술프히드릴 기를 보유하는 변형된 가교체를 함유하는 다중특이적 항체 또는 항체 유사체와 말레이미도-ABP의 반응에 의해 합성되었다.

[0202] 예시적인 알부민 결합 웨티드 서열은 서열 23-27에 열거된 아미노산 서열을 포함하나 이에 제한되지 않는다:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	서열 23
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	서열 24
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	서열 25
RLIEDICLPRWGCLWEDDF	서열 26
DICLPRWGCLW	서열 27

[0203]

[0204] 알부민 결합 웨티드 (ABP) 서열은 다수의 종 (마우스, 래트, 토끼, 소, 레서스, 개코원숭이 및 인간)으로부터의 알부민에 K_d (토끼) = $0.3 \mu M$ 으로 결합한다. 알부민 결합 웨티드는 알부민에 결합하는 것으로 공지된 리간드와 경쟁하지 않고, 토끼에서 2.3 시간의 반감기 ($T_{1/2}$)를 갖는다.

[0205]

약물 접합체

[0206]

본 발명의 다중특이적 항체 및 항체 유사체, 특히 유리 술프히드릴 기를 갖는 변형된 가교체로 합성된 것은, 반응성 술프히드릴 기를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착될 수 있는 임의의 치료제, 즉 약물 모이어티와 접합될 수 있다.

[0207]

항체-약물 접합체 (ADC) 화합물의 예시적인 실시양태는 다중특이적 항체 또는 항체 유사체 (각각 하기 논의에서 Ab로 지칭됨), 및 약물 모이어티 (D)를 포함하고, 여기서 다중특이적 항체 또는 항체 유사체는 유리 술프히드릴 기 (L)를 갖는 변형된 가교체로 합성되고, 항체는 유리 술프히드릴 기를 통해 D에 부착되고; 조성물을 하기 화학식 I을 갖는다:

[0208]

<화학식 I>

[0209]

$Ab-(L-D)_p$

[0210]

여기서, p 는 1, 2, 3 또는 4이다. 다중특이적 항체 또는 항체 유사체에 티올 반응성 링커 모이어티를 통해 접합될 수 있는 약물 모이어티의 수는 본원에 기재된 방법에 의해 도입된 반응성 티올의 수에 의해 제한된다.

[0211]

항체-약물 접합체 화합물 (ADC)의 또 다른 예시적인 실시양태는 다중특이적 항체 또는 항체 유사체 (Ab), 알부민-결합 웨티드 (ABP) 및 약물 모이어티 (D)를 포함하고, 여기서 항체는 링커 모이어티 (L)에 의해 약물 모이어티에 부착되고, 항체가 아미드 결합 또는 제2 링커 모이어티에 의해 알부민-결합 웨티드에 부착되며; 조성물을 하기 화학식 Ia를 갖는다:

[0212]

<화학식 Ia>

[0213]

$ABP-Ab-(L-D)_p$

[0214]

여기서, p 는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0215]

본 발명의 ADC 화합물은 항암 활성에 대한 유용성이 있는 것을 포함한다. 특히, 화합물은 약물 모이어티, 즉 독소에 링커에 의해 접합된, 즉 공유 결합에 의해 부착된 항체를 포함한다. 약물이 항체에 접합되지 않은 경우, 약물은 세포독성 또는 세포증식억제 효과를 갖는다. 따라서, 약물 부분의 생물학적 활성은 항체에의 접합에 의해 조정된다. 본 발명의 다중특이적 항체-약물 접합체 및 항체 유사체-약물 접합체 (ADC)는 유효 용량의 세포독성제를 종양 조직으로 선택적으로 전달하여, 더 높은 선택도, 즉 더 낮은 효능 용량이 달성될 수 있다.

[0216]

한 실시양태에서, 본 발명의 ADC 또는 ADC의 세포내 대사물의 생체이용률은 ADC의 약물 모이어티를 포함하고 항체 성분이 결여된 약물 화합물과 비교하였을 때 포유동물에서 개선된다. 또한, ADC 또는 ADC의 세포내 대사물

의 생체이용률은 약물 모이어티가 결여된 ADC의 항체 성분과 비교하였을 때 포유동물에서 개선된다.

약물 모이어티

항체-약물 접합체 (ADC)의 약물 모이어티 (D)는 세포독성 또는 세포증식억제 효과를 갖는 임의의 화합물, 모이어티 또는 군을 포함한다. 약물 모이어티는 다음을 포함한다: (i) 미세소관 억제제, 유사분열 억제제, 토포이소머라제 억제제 또는 DNA 인터칼레이터로 기능할 수 있는 화학요법제; (ii) 효소적으로 기능할 수 있는 단백질독소; 및 (iii) 방사성동위원소.

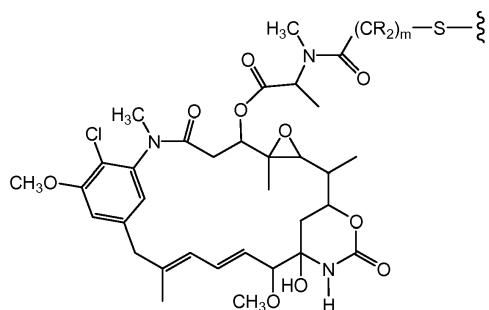
예시적인 약물 모이어티는 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 돌라스타틴, 트리코테센, CC1065, 칼리케아미신 및 상이한 에네디인 항생제, 탁산, 안트라시클린, 및 그의 임체이성질체, 동배체, 유사체 또는 유도체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

메이탄시노이드 약물 모이어티로 사용하기에 적합한 메이탄신 화합물을 당업계에 주지되어 있고, 공지된 방법에 따라 천연 공급원으로부터 단리되거나, 유전자 조작 기술을 이용하여 생성할 수 있거나 (문헌 [Yu et al. (2002) PROC. NAT. ACAD. SCI. (USA) 99:7968-7973]), 또는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체는 공지된 방법에 따른 합성에 의해 제조될 수 있다.

예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 하기와 같은 변형된 방향족 고리를 갖는 것: C-19-데클로로 (US 4256746) (안사마이토신 P2의 수소화알루미늄리튬 환원에 의해 제조); C-20-히드록시 (또는 C-20-데메틸) +/− C-19-데클로로 (미국 특허 번호 4361650 및 4307016) (스트렙토미세스 (*Streptomyces*) 또는 악티노미세스 (*Actinomyces*)를 사용한 탈메틸화 또는 LAH를 사용한 탈염소화에 의해 제조); 및 C-20-데메톡시, C-20-아실옥시 (−OCOR), +/−데클로로 (미국 특허 번호 4,294,757) (아실 클로라이드를 사용한 아실화에 의해 제조), 및 다른 위치에 변형을 갖는 것을 포함한다.

예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 또한 C-9-SH (미국 특허 번호 4,424,219) (메이탄시놀과 H₂S 또는 P₂S₅의 반응에 의해 제조); C-14-알콕시메틸(테메톡시/CH₂OR) (US 4331598); C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH₂OH 또는 CH₂OAc) (미국 특허 번호 4,450,254) (노카르디아 (Nocardia)로부터 제조); C-15-히드록시/아실옥시 (미국 특허 번호 4,364,866) (스트렙토미세스에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 제조); C-15-메톡시 (미국 특허 번호 4,313,946 및 4,315,929) (트레위아 누들플로라 (Trewia nudiflora)로부터 단리); C-18-N-데메틸 (미국 특허 번호 4,362,663 및 4,322,348) (스트렙토미세스에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조); 및 4,5-데옥시 (US 4,371,533) (메이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의해 제조)와 같은 변형을 갖는 것을 포함한다. 메이탄신 화합물 상의 많은 위치가 연결 유형에 따라 연결기 위치로서 유용한 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, 에스테르 연결을 형성하기 위해, 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치가 모두 적합하다.

화학식 I의 황체-야물 접합체 (ADC)의 약물 모이어티 (D)는 하기 구조를 갖는 메이탄시노이드를 포함한다:



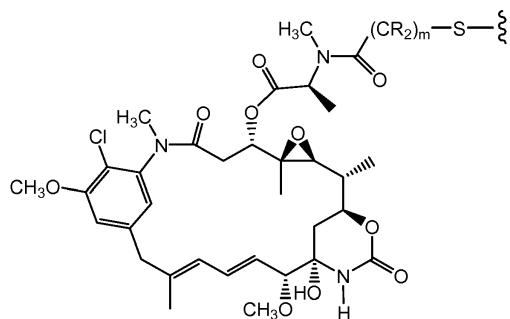
여기서, 파선은 항체-약물 접합체 (ADC)의 링커 (L)에 D의 황 원자의 공유 결합에 의한 부착을 나타낸다. R은 독립적으로 H, 또는 메틸, 에틸, 1-프로필, 2-프로필, 1-부틸, 2-메틸-1-프로필, 2-부틸, 2-메틸-2-프로필, 1-펜틸, 2-펜틸, 3-펜틸, 2-메틸-2-부틸, 3-메틸-2-부틸, 3-메틸-1-부틸, 2-메틸-1-부틸, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실, 2-메틸-2-펜틸, 3-메틸-2-펜틸, 4-메틸-2-펜틸, 3-메틸-3-펜틸, 2-메틸-3-펜틸, 2,3-디메틸-2-부틸 및 3,3-디메틸-2-부틸로부터 선택된 C₁-C₆ 알킬일 수 있다. 황 원자에 아미드 기를 부착시키는 알킬렌 쇄는 메타닐, 에타닐 또는 프로필일 수 있고, 즉 β 은 1, 2 또는 3이다.

메이탄신 화학물은 미세소관 단백질, 튜불린의 중합의 억제를 통하여 유사분열 동안 미세소관의 형성을 억제함

으로써 세포 증식을 억제한다 (문헌 [Remillard et al. (1975) Science 189:1002-1005]). 메이탄신과 메이탄시노이드는 고도로 세포독성이지만, 암 요법에 있어서의 그의 임상적 용도는 상당히 제한되는데, 이는 주로 종양에 대한 선택성 불량으로 인한 중증의 전신 부작용 때문이다. 메이탄신을 이용한 임상 시험은 중추 신경계 및 위장계에 대한 심각한 부작용으로 인해 중단되었다 (문헌 [Issel et al. (1978) Can. Treatment. Rev. 5:199-207]).

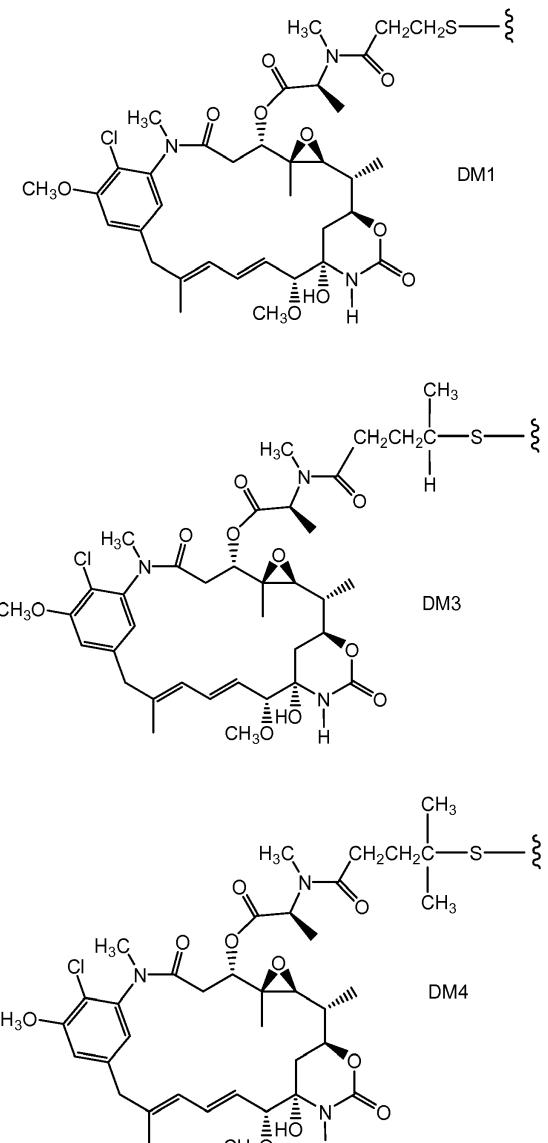
[0227] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의한 제조에 비교적 이용가능하고, (ii) 비-디슬피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체-약물 접합체에서 매력적인 약물 모이어티이다 (US 2005/0169933; WO 2005/037992; 미국 특허 번호 5,208,020).

[0228] 다른 약물 모이어티와 같이, 메이탄시노이드 약물 모이어티의 모든 입체이성체, 즉 D의 키랄 탄소에서 R 배위와 S 배위의 모든 조합물이 본 발명의 화합물에 대해 고려된다. 한 실시양태에서, 메이탄시노이드 약물 모이어티 (D)는 하기 입체화학을 가질 것이다:



[0229]

[0230] 메이탄시노이드 약물 모이어티의 예시적인 실시양태는 하기 구조를 갖는 DM1, $(CR_2)_m = CH_2CH_2$; DM3, $(CR_2)_m = CH_2CH_2CH(CH_3)$; 및 DM4, $(CR_2)_m = CH_2CH_2C(CH_3)_2$ 를 포함한다:



[0231]

[0232]

링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결 부는 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실 기와의 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실 기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실 기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실 기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

[0233]

화학식 I의 항체-약물 접합체 (ADC)의 약물 모이어티 (D)는 또한 돌라스타틴 및 그의 펩티드성 유사체 및 유도체, 아우리스타틴 (미국 특허 번호 5,635,483; 5,780,588)을 포함한다. 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세소관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584]), 항암 (미국 특허 번호 5,663,149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 다양한 형태의 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통하여 항체에 공유 결합에 의해 부착될 수 있다 (WO 02/088172; 문헌 [Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784]; [Francisco et al. (2003) *Blood* 102(4):1458-1465]).

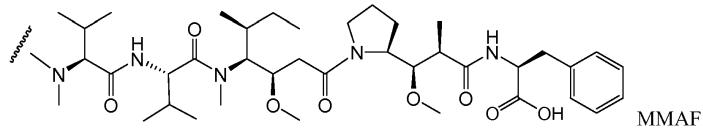
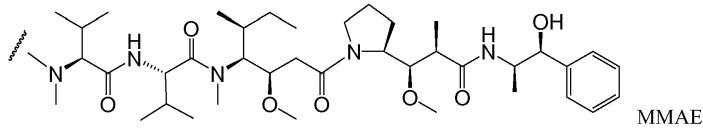
[0234]

약물 모이어티는 돌라스타틴, 아우리스타틴 (미국 특허 번호 5,635,483; 5,780,588; 5,767,237; 6,124,431) 및 그의 유사체 및 유도체를 포함한다. 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세소관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584]), 항암 (US 5663149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N

(아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0235] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 WO 2005/081711; 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623] (2004년 3월 28일 제출)에 개시된, N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다.

[0236] 화학식 I의 항체-약물 접합체 (ADC)의 약물 모이어티 (D)는 항체에 N-말단을 통하여 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 MMAE 및 MMAF를 포함하고, 하기 구조를 갖는다:



[0237] [0238] 전형적으로, 펩티드-기재의 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합 형성으로 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 주지된 액체 상 합성 방법 (문헌 [E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조할 수 있다.

[0239] 약물 모이어티는 칼리케아미신 및 그의 유사체 및 유도체를 포함한다. 칼리케아미신 패밀리의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA 절단부를 생성할 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 접합체 제조에 대해서는 미국 특허 번호 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701, 5,770,710; 5,773,001; 5,877,296을 참조한다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-아세틸- γ_1^1 , PSAG 및 Θ_1^1 을 포함하나 이에 제한되지 않는다 (문헌 [Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998)]).

[0240] 단백질 독소는 다음을 포함한다: 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A 쇄 (문헌 [Vitetta et al. (1987) Science, 238:1098]), 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 그 트리코테센 (WO 93/21232).

[0241] 치료 방사성동위원소는 다음을 포함한다: ^{32}P , ^{33}P , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{131}In , ^{153}Sm , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , 및 Lu의 방사성 동위원소.

[0242] 방사성동위원소 또는 상이한 표지는 공지된 방식으로 접합체에 혼입될 수 있다 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57]; ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" Chatal, CRC Press 1989]). 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성핵종의 접합을 위한 예시적인 퀄레이트화제이다 (WO 94/11026).

[0243] 링커

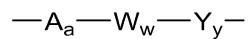
[0244] "링커" (L)은 하나 이상의 약물 모이어티 (D) 및 항체 단위 (Ab)를 연결하여 화학식 I의 다중특이적 항체-약물 접합체 또는 항체 유사체-약물 접합체 (ADC)를 형성할 수 있는 이관능성 또는 다관능성 모이어티이다. ADC는 약물 및 Ab에 대한 결합에 대해 반응성 관능기를 갖는 링커를 사용하여 편리하게 제조될 수 있다. Ab는 링커 시약, 약물 모이어티 또는 약물-링커 중간체의 관능기와 결합을 형성할 수 있다.

[0245] 한 측면에서, 링커는 항체 또는 항체 단편 상에 존재하는 친핵성 시스테인에 반응성인 친전자성 기를 갖는 반응성 부위를 갖는다. 항체 또는 항체 단편의 시스테인 티올은 링커 상의 친전자성 기와 반응성이고, 링커에 대한 공유 결합을 형성한다. 유용한 친전자성 기는 말레이미드 및 할로아세트아미드 기를 포함하나 이에 제한되지

않는다.

[0246] 시스테인 조작된 항체 또는 항체 단편은 문헌 [Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773]의 페이지 766의 접합 방법 및 실시예에 기재된 방법에 따라 링커 시약 또는 약물-링커 중간체, 친전자성 관능기, 예컨대 말레이미드, 또는 α -할로 카르보닐과 반응한다.

[0247] 한 실시양태에서, ADC의 링커 L은 하기 식을 갖는다:



[0249] 여기서,

[0250] $-A-$ 는 항체 (Ab)의 시스테인 티올에 공유 결합에 의해 부착된 스트레쳐 단위이고; a 는 0 또는 1이고;

[0251] 각각의 $-W-$ 는 독립적으로 아미노산 단위이고;

[0252] w 는 독립적으로 0 내지 12 범위의 정수이고;

[0253] $-Y-$ 는 약물 모이어티에 공유 결합에 의해 부착된 스페이서 단위이고;

[0254] y 는 0, 1 또는 2이다.

[0255] 스트레쳐 단위

[0256] 스트레쳐 단위 ($-A-$)는 존재하는 경우, 항체 단위를 아미노산 단위 ($-W-$)에 연결시킬 수 있다. 이와 관련하여, 항체 (Ab)는 스트레쳐 단위의 친전자성 관능기와 결합을 형성할 수 있는 유리 시스테인 티올 기 또는 다른 유리 티올 기를 갖는다. 이 실시양태에서 대표적인 스트레쳐 단위를 화학식 IIIa 및 IIIb의 대괄호 안에 도시하고, 여기서 $Ab-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w 및 y 는 상기 정의된 바와 같고, R^{17} 은 $(CH_2)_r$, C_3-C_8 카르보시클릴, $O-(CH_2)_r$, 아릴렌, $(CH_2)_r$ -아릴렌, -아릴렌- $(CH_2)_r$ -, $(CH_2)_r$ - $(C_3-C_8$ 카르보시클릴), $(C_3-C_8$ 카르보시클릴)- $(CH_2)_r$, C_3-C_8 헤테로시클릴, $(CH_2)_r$ - $(C_3-C_8$ 헤테로시클릴), $-(C_3-C_8$ 헤테로시클릴)- $(CH_2)_r$ -, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ -, $-(CH_2CH_2O)_r$ -, $-(CH_2CH_2O)_r$ - CH_2 -, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ -, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ - CH_2 -, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ - CH_2 -, 및 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ -로부터 선택된 2가 라디칼이고; 여기서 R^b 는 H , C_1-C_6 알킬, 페닐 또는 벤질이고; r 은 독립적으로 1-10 범위의 정수이다.

[0257] 아릴렌은 모 방향족 고리계로부터 2개의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 6-20개 탄소 원자의 2가 방향족 탄화 수소 라디칼을 포함한다. 전형적 아릴렌기는 벤젠, 치환된 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 비페닐 등으로부터 유래된 라디칼을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0258] 헤테로시클릴 기는 하나 이상의 고리 원자가 헤테로원자, 예를 들어 질소, 산소, 및 황인 고리계를 포함한다. 헤테로사이클 라디칼은 탄소 원자 1 내지 20개 및 N, O, P 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개를 포함한다. 헤테로사이클은 3 내지 7개의 고리원 (2 내지 6개의 탄소 원자, 및 N, O, P 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자)을 갖는 모노사이클일 수 있거나, 또는 7 내지 10개의 고리원 (4 내지 9개의 탄소 원자, 및 N, O, P 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤�테로원자)을 갖는 비사이클, 예를 들어 비시클로 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템일 수 있다. 헤�테로사이클은 문헌 [Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)], 특히 제1, 3, 4, 6, 7 및 9장; ["The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)], 특히 제13, 14, 16, 19 및 28권; 및 [J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566]에 기재되어 있다.

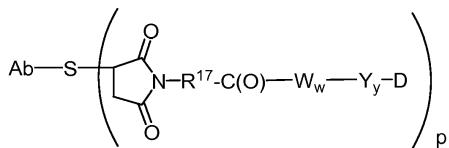
[0259] 헤테로사이클의 예는 피리딜, 디히드로피리딜, 테트라히드로피리딜 (피페리딜), 티아졸릴, 테트라히드로티오페닐, 황 산화 테트라히드로티오페닐, 피리미디닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조푸라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 쿠놀리닐, 이소쿠놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라히드로푸라닐, 비스-테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 비스-테트라히드로피라닐, 테트라히드로쿠놀리닐, 테트라히드로이소쿠놀리닐, 데카히드로쿠놀리닐, 옥타히드로이소쿠놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조푸라닐, 크로메닐, 크산테닐, 페녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 피라

지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 푸리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 시놀리닐, 프테리디닐, 4Ah-카르바졸릴, 카르바졸릴, β -카르볼리닐, 페난트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 페난트롤리닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 푸라자닐, 페녹사지닐, 이소크로마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 페라졸리디닐, 페라졸리닐, 페페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 퀴누클리디닐, 모르폴리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥신돌릴, 벤족사졸리닐 및 이사티노일을 포함하나 이로 제한되지 않는다.

[0260] 카르보시클릴 기는 모노사이클로서 탄소 원자 3 내지 7개 또는 비사이클로서 탄소 원자 7 내지 12개를 갖는 포화 또는 불포화 고리를 포함한다. 모노시클릭 카르보사이클은 3 내지 6개의 고리 원자, 보다 통상적으로는 5 또는 6개의 고리 원자를 갖는다. 비시클릭 카르보사이클은 예를 들어 비시클로 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 7 내지 12개, 비시클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 9 또는 10개를 갖는다. 모노시클릭 카르보사이클의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 1-시클로펜트-1-에닐, 1-시클로펜트-2-에닐, 1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, 1-시클로헥스-1-에닐, 1-시클로헥스-2-에닐, 1-시클로헥스-3-에닐, 시클로헵틸, 및 시클로옥틸을 포함한다.

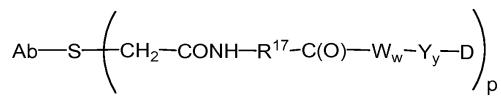
[0261] 명확하게 도시되지 않은 경우에도 반응성 티올 기의 수에 따라 1 내지 4개의 약물 모이어티가 항체 ($p = 1-4$)에 연결됨을, 화학식 I ADC, 예컨대 III-VI의 모든 예시적인 실시양태로부터 이해하여야 한다.

[0262] <화학식 IIIa>



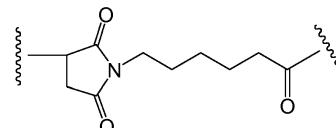
[0263]

[0264] <화학식 IIIb>



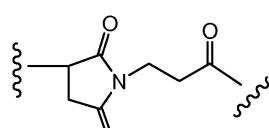
[0265]

[0266] 예시적인 스트레쳐 단위는 화학식 IIIa의 것이고, 말레이미도-카프로일 (MC)로부터 유래되고, 여기서 R^{17} 은 $-(CH_2)_5-$ 이다:



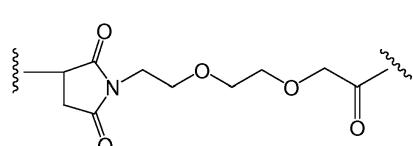
[0267]

[0268] 예시적인 스트레쳐 단위는 화학식 IIIa의 것이고, 말레이미도-프로파노일 (MP)로부터 유래되고, 여기서 R^{17} 은 $-(CH_2)_2-$ 이다:



[0269]

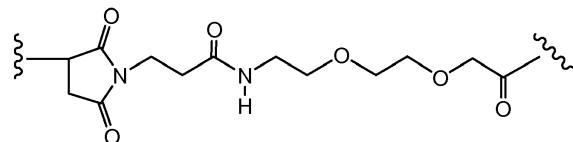
[0270] 또 다른 예시적인 스트레쳐 단위는 화학식 IIIa의 것이고, 여기서 R^{17} 은 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 이고, r 은 2이다:



[0271]

[0272] 또 다른 예시적인 스트레쳐 단위는 화학식 IIIa의 것이고, 여기서 R^{17} 은 $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 이고, 여기

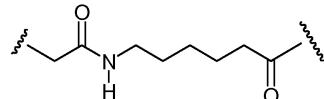
서 R^b 는 H이고, 각각의 r 은 2이다:



[0273]

MPEG

또 다른 예시적인 스트레쳐 단위는 화학식 IIIb의 것이고, 여기서 R^{17} 은 $-(CH_2)_5-$ 이다:

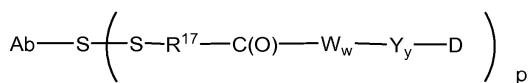


[0275]

또 다른 실시양태에서, 스트레쳐 단위는 항체의 황 원자와 스트레쳐 단위의 황 원자 사이의 디솔피드 결합을 통해 항체에 연결된다. 이 실시양태의 대표적인 스트레쳐 단위는 하기 화학식 IV의 대괄호 안에 도시되고, 여기서 R^{17} , $Ab-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w 및 y 는 상기 정의된 바와 같다.

[0277]

<화학식 IV>

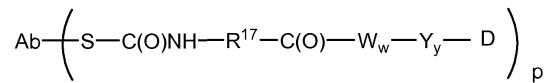


[0278]

또 다른 실시양태에서, 스트레쳐의 반응기는 항체의 유리 시스테인 티올 또는 다른 유리 티올과 결합을 형성할 수 있는 티올-반응성 관능기를 함유한다. 티올-반응성 관능기의 예는 말레이미드, α -할로아세틸, 활성화된 에스테르, 예컨대 숙신이미드 에스테르, 4-나트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 무수물, 산 클로라이드, 술포닐 클로라이드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이 실시양태의 대표적인 스트레쳐 단위는 하기 화학식 Va 및 Vb의 대괄호 안에 도시되고, 여기서 $-R^{17}-$, $Ab-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w 및 y 는 상기 정의된 바와 같다:

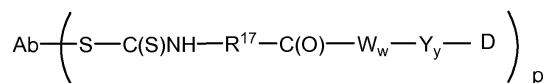
[0280]

<화학식 Va>



[0281]

<화학식 Vb>



[0283]

다른 실시양태에서, 링커는 1개 초과의 약물 모이어티를 분지화 다관능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 (문헌 [Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]; [King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990]). 수지상 링커는 ADC의 효력과 관련이 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로딩을 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스테인 조작된 항체가 단지 1개의 반응성 시스테인 티올기를 보유하고 있는 경우에는, 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통해 부착시킬 수 있다.

[0285]

아미노산 단위

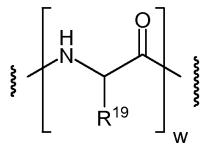
[0286]

링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 아미노산 단위 ($-W_w-$)는 존재하는 경우에 본 발명의 시스테인 조작된 항체-약물 접합체 (ADC)의 약물 모이어티 (D)에 항체 (Ab)를 연결시킨다.

[0287]

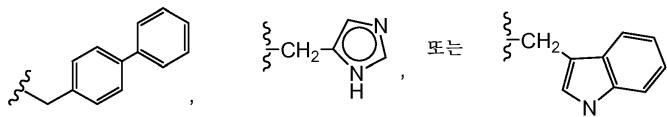
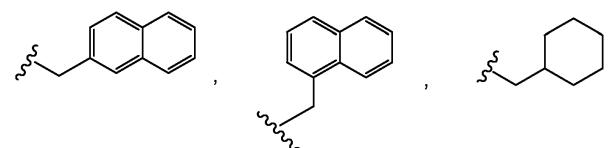
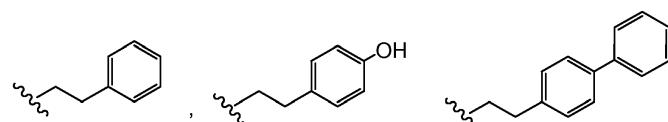
$-W_w-$ 는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 펜타펩티드, 헥사펩티드, 헵타펩티드, 옥타펩티드, 노나펩티드, 테카펩티드, 운데카펩티드 또는 도데카펩티드 단위이다. 아미노산 단위를 포함하는 아미노산 잔기는 자연 발생 아미노산, 뿐만 아니라 소수의 아미노산 및 비-자연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함한다.

각각의 $-W_w$ - 단위는 독립적으로 하기 대괄호 안에 표시된 화학식을 갖고, w 는 0 내지 12 범위의 정수이다:



[0288]

[0289] 여기서 R^{19} 는 수소, 메틸, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸, 벤질, p-히드록시벤질, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-페리딜메틸-, 3-페리딜메틸-, 4-페리딜메틸-, 페닐, 시클로헥실,



또는

[0290]

이다.

[0291]

아미노산 단위는 종양-관련 프로테아제를 포함하는 1종 이상의 효소에 의해 효소적으로 절단되어 약물 모이어티 (-D)를 유리시킬 수 있으며, 한 실시양태에서, 약물 모이어티 방출시에 생체내에서 양성자화되어 약물 (D)를 제공한다.

[0292]

유용한 $-W_w$ - 단위는 특정 효소, 예를 들어 종양-관련 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 이들 선택성에서 설계 및 촉진화될 수 있다. 한 실시양태에서, $-W_w$ - 단위는 그의 절단이 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의해 촉매되는 것이다.

[0293]

예시적인 $-W_w$ - 아미노산 단위는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)을 포함한다. 예시적인 트리펩티드는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함한다.

[0294]

R^{19} 가 수소 이외의 상이한 기인 경우에, R^{19} 가 부착되는 탄소 원자는 키랄이다. R^{19} 가 부착되는 각각의 탄소 원자는 독립적으로 (S) 또는 (R) 배위, 또는 라세미 혼합물로 존재한다. 따라서, 아미노산 단위는 거울상이성질체적으로 순수하거나, 라세미체, 또는 부분입체이성질체일 수 있다.

[0295]

스페이서 단위

[0296]

스페이서 단위 ($-Y_y-$)는 존재하는 경우 ($y = 1$ 또는 2) 아미노산 단위가 존재할 때 ($w = 1-12$) 아미노산 단위 ($-W_w-$)를 약물 모이어티 (D)에 연결시킨다. 대안적으로, 스페이서 단위는 아미노산 단위가 존재하지 않을 때 스퍼레이서 단위를 약물 모이어티에 연결시킨다. 아미노산 단위와 스퍼레이서 단위가 모두 존재하지 않을 때 ($w, y = 0$), 스퍼레이서 단위도 약물 모이어티를 항체 단위에 연결시킨다. 스퍼레이서 단위는 자기 회생적 및 비-자기 회생적의 두 종류가 존재한다. 비-자기 회생적 스퍼레이서 단위는 항체-약물 접합체 또는 약물 모이어티-링커로부터 아미노산 단위의 절단, 특히 효소적 절단 후에 일부 또는 모든 스퍼레이서 단위가 약물 모이어티에 결합된 상태로 유지되는 단위다. 글리신-글리신 스퍼레이서 단위 또는 글리신 스퍼레이서 단위를 포함하는 ADC가 종양 세포 연관 프로테아제, 암 세포 연관 프로테아제 또는 램프구 연관 프로테아제를 통한 효소적 절단을 거칠 경우, 글

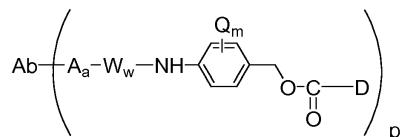
리신-글리신-약물 모이어티 또는 글리신-약물 모이어티는 $Ab-A_a-W_w$ -로부터 절단된다. 한 실시양태에서, 독립적인 가수분해 반응은 표적 세포 내에서 발생하고, 글리신-약물 모이어티 결합을 절단하여 약물을 방출시킨다.

[0297] 또 다른 실시양태에서, $-Y_y-$ 는 그의 페닐렌 부분이 Q_m 으로 치환된 p-아미노벤질카르바모일 (PAB) 단위이고 (반응식 2 및 3 참조), 여기서 Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m 은 0-4 범위의 정수이다.

[0298] 비자기 희생적 스페이서 단위 ($-Y-$)의 예시적인 실시양태는 $-Gly-Gly-$; $-Gly-$; $-Ala-Phe-$; $-Val-Cit-$ 이다.

[0299] 한 실시양태에서, 스페이서 단위가 존재하지 않는 ($y=0$) 약물 모이어티-링커 또는 ADC 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물이 제공된다.

[0300] 대안적으로, 자기 희생적 스페이서 단위를 포함하는 ADC는 $-D$ 를 방출할 수 있다. 한 실시양태에서, $-Y-$ 는 PAB 기의 아미노 질소 원자를 통하여 $-W_w-$ 에 연결되고, 카르보네이트, 카르바메이트 또는 에테르 기를 통해 $-D$ 에 직접적으로 연결된 PAB 기이며, ADC는 하기 예시적인 구조를 갖는다:



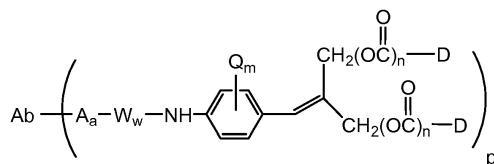
[0301]

여기서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m 은 0-4 범위의 정수이고, p 는 1 내지 4 범위이다.

[0303] 자기 희생적 스페이서의 다른 예는 PAB 기에 전기적으로 유사한 방향족 화합물, 예컨대 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (문헌 [Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237]) 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질 아세탈을 포함하거나 이에 제한되지 않는다. 아미드 결합 가수분해시에 고리화되는 스페이서, 예컨대 치환 및 비치환된 4-아미노부티르산 아미드 (문헌 [Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2:223]); 적절하게 치환된 비시클로[2.2.1] 및 비시클로[2.2.2] 고리계 (문헌 [Storm et al. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815]); 및 2-아미노페닐프로피온산 아미드 (문헌 [Amsberry, et al. (1990) J. Org. Chem. 55:5867])를 사용할 수 있다. 글리신에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 (문헌 [Kingsbury et al. (1984) J. Med. Chem. 27:1447])도 또한 ADC에서 유용한 자기 희생적 스페이서의 예이다.

[0304]

한 실시양태에서, 스페이서 단위는 분지형 비스(히드록시메틸)스티렌 (BHMS)이고, 이는 다중 약물을 혼입 및 방출시키는데 사용될 수 있고, 2-(4-아미노벤질리덴)프로판-1,3-디올 텐드리며 단위 (WO 2004/043493; 문헌 [de Groot et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494])를 포함하는 하기 구조를 갖는다:



[0305]

여기서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m 은 0-4 범위의 정수이고; n 은 0 또는 1이고; p 는 1 내지 4의 범위이다.

[0307]

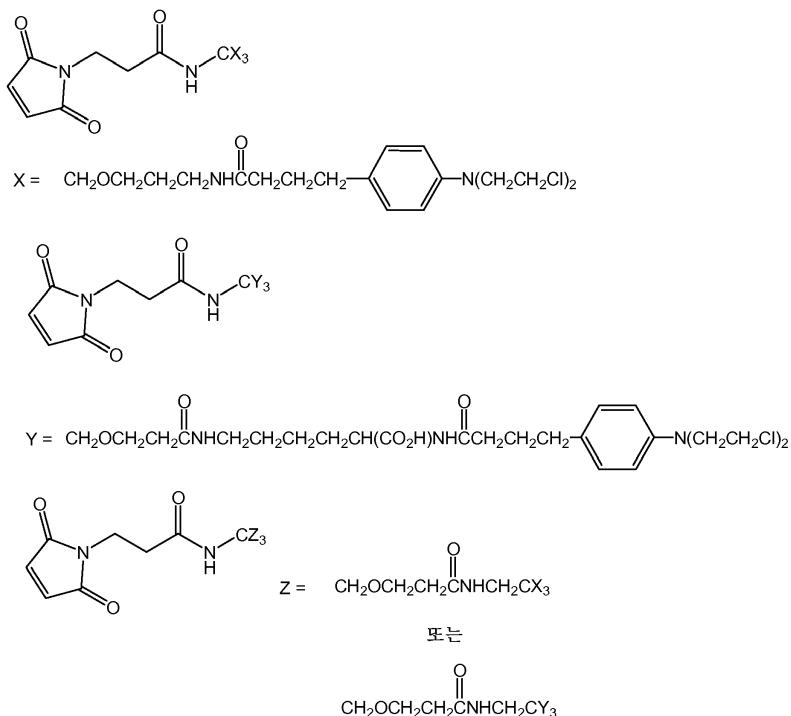
수지상 링커

[0308]

다른 실시양태에서, 링커 L은 1개 초과의 약물 모이어티를 분지화 다관능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 (문헌 [Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]). 수지상 링커는 ADC의 효력과 관련이 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로딩을 증가시킬 수 있다. 따라서, 항체가 단지 1개의 반응성 티올 기를 보유하는 경우에는 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통해 부착시킬 수 있다.

[0309]

수지상 링커 시약의 하기 예시적인 실시양태는 클로로에틸 질소 머스타드 관능기와의 반응에 의해 9개까지의 친핵성 약물 모이어티 시약이 접합되도록 허용한다:



[0310]

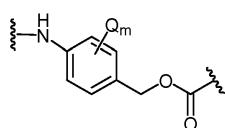
[0311] 스페이서 단위의 또 다른 실시양태에서, 자기 희생적 2,6-비스(히드록시메틸)-p-크레졸 및 2,4,6-트리스(히드록시메틸)-페놀 덴드리머 단위를 갖는 분지형, 수지상 링커 (WO 2004/01993; 문현 [Szalai et al. (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125:15688-15689]; [Shamis et al. (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126:1726-1731]; [Amir et al. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4494-4499])가 본 발명의 화합물에서 링커로 사용될 수 있다.

[0312]

[0313]

[0314]

[0315] <학한식 X>



[0316]

[0317] (여기서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4 범위의 정수임);

[0318]

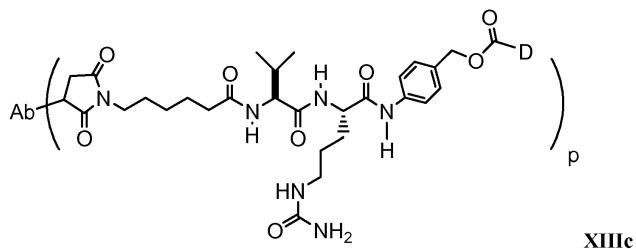
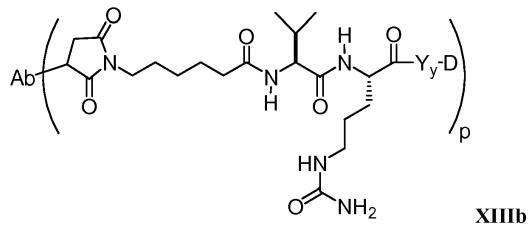
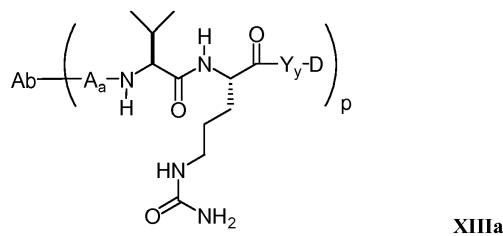
[0219] 

[0320]



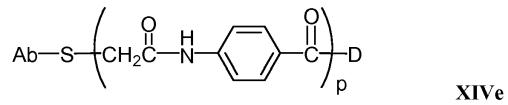
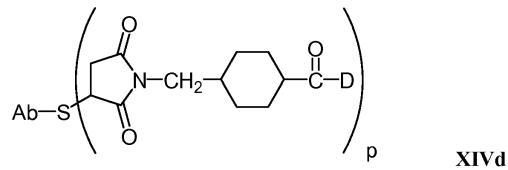
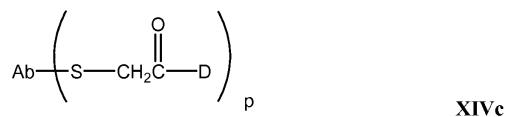
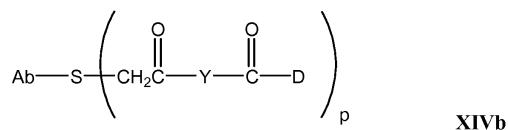
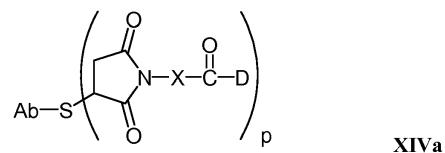
[0322]

[0322] 화학식 I 항체-약물 접합체 화합물의 실시양태는 XIIIa (val-cit), XIIIb (MC-val-cit), XIIIc (MC-val-cit-PAB)를 포함한다:



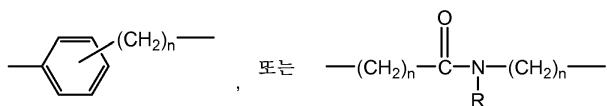
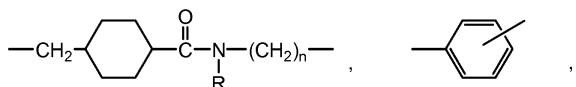
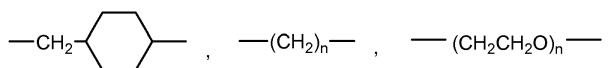
[0323]

화학식 Ia 항체-약물 접합체 화합물의 다른 예시적인 실시양태는 XIVa-e를 포함한다:



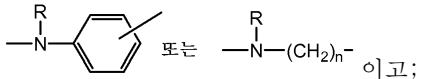
[0325]

여기서, X는



[0327] 이고;

[0328] Y는

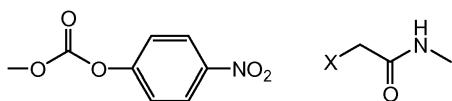
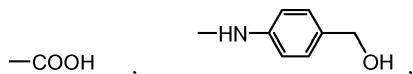


[0330] R은 독립적으로 H 또는 C₁-C₆ 알킬이고; n은 1 내지 12이다.

[0331] 또 다른 실시양태에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친전자성 기에 반응성인 친핵성 기를 갖는 반응성 관능기를 갖는다. 항체 상의 유용한 친전자성 기는 알데하이드 및 케톤 카르보닐 기를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 링커의 친핵성 기의 혜택로원자는 항체 상의 친전자성 기와 반응하여 항체 단위에 공유 결합을 형성할 수 있다. 링커 상의 유용한 친핵성 기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 항체 상의 친전자성 기는 링커와의 부착에 편리한 부위를 제공한다.

[0332] 전형적으로, 펩티드-타입 링커는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이에 펩티드 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 이러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 주지된 액체 상 합성 방법 (문헌 [E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press])에 따라 제조할 수 있다.

[0333] 링커 중간체는 스페이서, 스트레쳐 및 아미노산 단위를 포함하여 임의의 조합물 또는 반응 서열과 회합될 수 있다. 스페이서, 스트레쳐 및 아미노산 단위는 특성상 친전자성, 친핵성, 또는 유리 라디칼인 반응성 관능기를 이용할 수 있다. 반응성 관능기는 하기를 포함하나 이에 제한되지 않는다:



[0334]

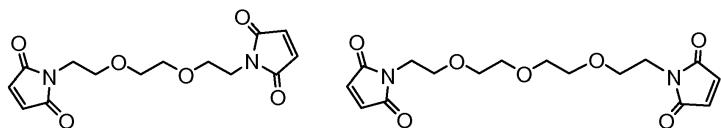
[0335] 여기서, X는 이탈기, 예를 들어 O-메실, O-토실, -Cl, -Br, -I; 또는 말레이미드이다.

[0336] 또 다른 실시양태에서, 링커는 용해도 또는 반응성을 조정한 기로 치환될 수 있다. 예를 들어, 대전된 치환기, 예를 들어 솔포네이트 (-SO₃⁻) 또는 암모늄은 시약의 수용성을 증가시키고, 링커 시약과 항체 또는 약물 모이어티와의 커플링 반응을 용이하게 하거나, 또는 ADC 제조에 사용되는 합성 경로에 따라 Ab-L (항체-링커 중간체)과 D, 또는 D-L (약물-링커 중간체)과 Ab와의 커플링 반응을 용이하게 할 수 있다.

[0337]

본 발명의 화합물은 링커 시약: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 솔포-EMCS, 솔포-GMBS, 솔포-KMUS, 솔포-MBS, 솔포-SIAB, 솔포-SMCC 및 솔포-SMPB, 및 SVSB (숙신 이미딜-(4-비닐솔폰)벤조에이트)을 사용하고, 비스-말레이미드 시약: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)₃, 및 B(PEO)₄ (피어스 바이오테크놀로지, 인크., 미국 61105 일리노이주 록포드 피.오. 박스 117, 고객 서비스 부서, 미국 1-800-874-3723, 국제번호 +815-968-0747)을 포함하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하나 이에 제한되지 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 페이지 467-498을 참조한다. 비스-말레이미드 시약은 시스테인 조작된 항체 또는 항체 단편의 티올 기를 순차적 또는 동시 방식으로, 티올-함유 약물 모이

어티, 표지 또는 링커 중간체에 부착되도록 한다. 시스테인 조작된 항체의 티올기, 약물 모이어티, 표지, 또는 링커 중간체와 반응성인, 말레이미드 이외의 다른 관능기는 아이오도아세트아미드, 브로모아세트아미드, 베닐 피리딘, 디솔피드, 피리딜 디솔피드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함한다.

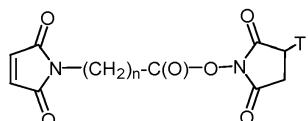


BM(PEO)₃

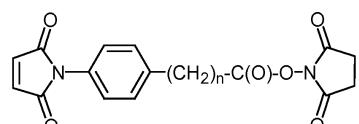
BM(PEO)₄

유용한 링커 시약은 또한 다른 상업적 공급원, 예컨대 몰레큘라 바이오사언시스 인크. (Molecular Biosciences Inc., 콜로라도주 볼더)를 통해 입수할 수 있거나, 또는 문헌 [Toki et al. (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872]; [Walker, M.A. (1995) *J. Org. Chem.* 60:5352-5355]; [Frisch et al. (1996) *Bioconjugate Chem.* 7:180-186]; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; 및 WO 04/032828에 기재된 절차에 따라 합성할 수 있다.

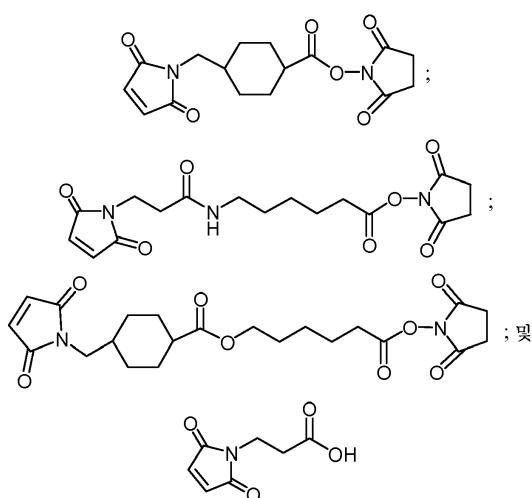
화학식 IIIa의 스트래쳐는 하기 링커 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커 내로 도입할 수 있다:



(여기서 n 은 1-10 범위의 정수이고, T 는 H 또는 $-SO_3Na$ 임):

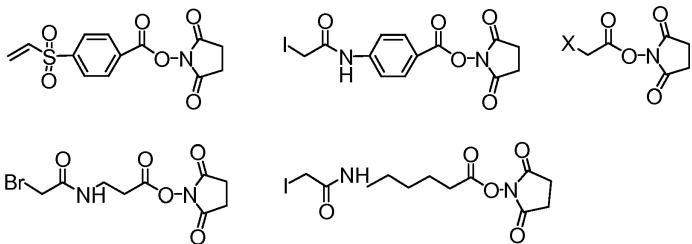


(연기선 $n=0$ 뱐지 3 범위의 정수인):



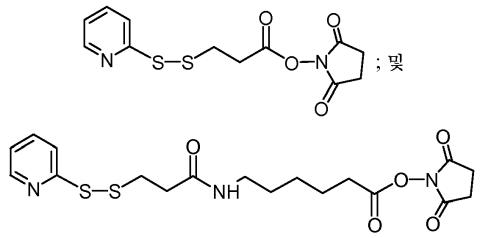
[0345]

[0346] 스트레쳐 단위는 하기 이관능성 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커 내로 도입할 수 있다:



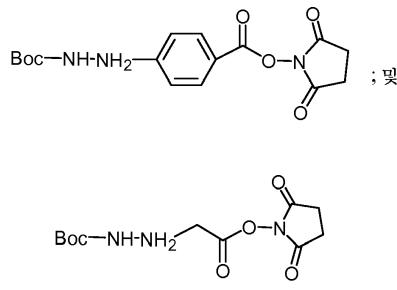
[0347]

[0348] 여기서, X는 Br 또는 I이다. 스트레쳐 단위는 또한 하기 이관능성 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커 내로 도입할 수 있다:



[0349]

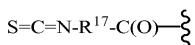
[0350] 화학식 Va의 스트레쳐 단위는 하기 중간체를 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커 내로 도입할 수 있다:



[0351]

[0352] 아래 나타낸 화학식의 이소티오시아네이트 스트레쳐는 문헌 [Angew. Chem., (1975) 87(14), 517]에 기재된 바와 같이 이소티오시아네이트카르복실산 클로라이드로부터 제조할 수 있다

[0353]

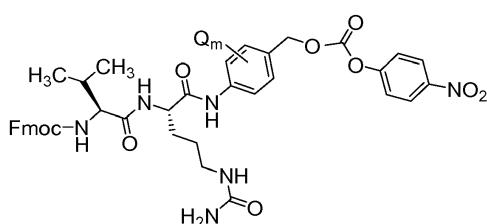


[0354]

여기서, $-R^{17}-$ 은 본원에 기재된 바와 같다.

[0355]

말레이이미드 스트레쳐 및 파라-아미노벤질카르바모일 (PAB) 자기 희생적 스페이서를 갖는 예시적인 발린-시트를린 (val-cit 또는 vc) 디펩티드 링커 시약은 하기 구조를 갖는다:



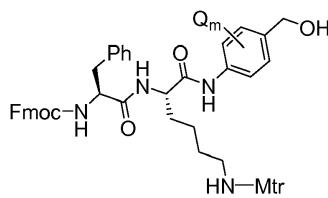
[0356]

[0357]

여기서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $-할로겐$, $-니트로$ 또는 $-시아노$ 이고; m은 0-4 범위의 정수이다.

[0358]

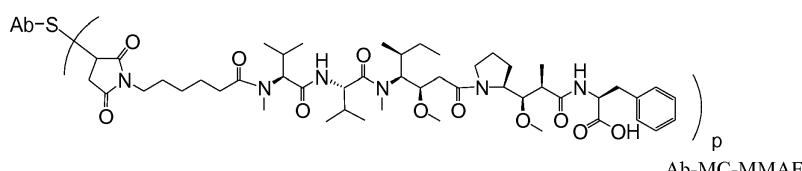
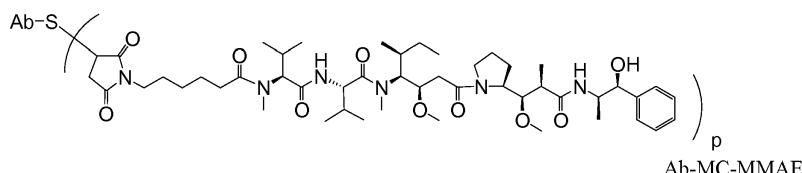
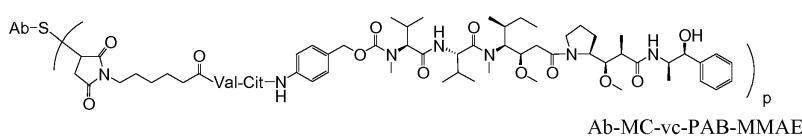
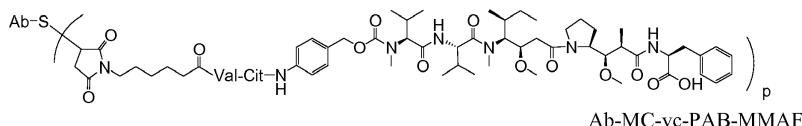
말레이이미드 스트레쳐 단위 및 p-아미노벤질 자기 희생적 스페이서 단위를 갖는 예시적인 phe-lys(Mtr) 디펩티드 링커 시약은 문헌 [Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60]에 따라 제조할 수 있고, 하기 구조를 갖는다:



[0359]

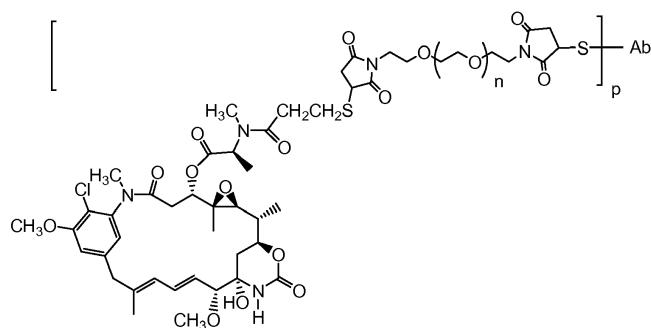
여기서, Mtr은 모노-4-메톡시트리틸이고, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $- 할로겐$, $- 니트로$ 또는 $- 시아노$ 이고, m은 0-4 범위의 정수이다.

[0361] 본 발명의 예시적인 항체-약물 접합체 화합물은 다음을 포함한다:



[0362]

여기서, Val은 발린이고, Cit는 시트룰린이고, p는 1, 2, 3 또는 4이고, Ab는 다중특이적 항체 또는 항체 유사체이다. 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1이 트拉斯투주맙의 티올 기에 BMPEO 링커를 통해 연결된 다른 예시적인 항체 약물 접합체는 하기 구조를 갖는다:



[0364]

여기서, Ab는 항체이고; n은 0, 1 또는 2이고; p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0366] 항체-약물 접합체의 제조

화학식 I의 ADC는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 몇몇 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 시스테인 조작된 항체 또는 항체 단편의 시스테인 기를 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 항체-링커 중간체 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 활성화된 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 약물-링커 중간체 D-L을 형성시킨 후, 이를 시스테인 조작된 항체의 시스테인 기와 반응시키는 방법. 접합 방법 (1) 및 (2)는 각종 시스테인 조작된 항체, 약물 모이어티 및 링커를 사용하여 화학식 I의 항체-약물 접합체를 제조할 수 있다.

- [0368] 항체 시스테인 티올 기는 친핵성이고, (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기; 및 (iv) 디술피드, 예를 들어 퍼리딜 디술피드 (술피드 교환을 통한)를 포함하는, 링커 시약 및 약물-링커 중간체 상의 친전자성 기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 약물 모이어티 상의 친핵성 기는 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드 기를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0369] 메이탄신은 예를 들어 May-SSCH₃으로 전환될 수 있고, 이는 유리 티올, May-SH로 환원되고, 변형된 항체와 반응하여 (문헌 [Chari et al. (1992) Cancer Research 52:127-131]) 디술피드 링커를 갖는 메이탄시노이드-항체 면역접합체를 생성할 수 있다. 디술피드 링커를 갖는 항체-메이탄시노이드 접합체는 보고되었다 (WO 04/016801; US 6884874; US 2004/039176 A1; WO 03/068144; US 2004/001838 A1; 미국 특허 번호 6441163, 5208020, 5416064; WO 01/024763). 디술피드 링커 SPP는 링커 시약 N-숙신이미딜 4-(2-퍼리딜티오) 펜타노에 이트로 구축한다.
- [0370] 특정 조건하에, 시스테인 조작된 항체 또는 항체 단편을 환원제, 예컨대 DTT (클레란드(Cleland) 시약, 디티오트레이터) 또는 TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드)로 처리하여 링커 시약과의 접합에 반응성이 되도록 할 수 있다 (문헌 [Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80]; 솔테크 벤처스(Soltec Ventures), 매사추세츠주 베벌리). CHO 세포에서 발현되는 전장, 시스테인 조작된 모노클로날 항체 또는 Fab (티오Mab; 티오Fab)은 약 50배 과량의 TCEP로 3시간 동안 37°C에서 환원시켜 새롭게 도입된 시스테인 잔기와 배양 배지에 존재하는 시스테인 사이에 형성될 수 있는 디술피드 결합을 환원시킬 수 있다. 환원된 티오Mab 또는 티오Fab을 희석하고, 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5) 중에서 하이트랩(HiTrap) S 칼럼에 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유하는 PBS로 용리하였다. 모 Mab에 존재하는 시스테인 잔기와 희석한 (200 nM) 수성 황산구리 (CuSO₄) 사이의 디술피드 결합은 실온에서 밤새 재확립될 수 있다. 당업계에 공지된 다른 산화제, 즉 산화 제제, 및 산화 조건이 사용될 수 있다. 주위 공기 산화도 효과적이다. 이 온화한 부분적 재산화 단계는 효율적으로 쇄내 디술피드를 고충실도로 형성시킨다. 대략 10배 과량의 약물-링커 중간체, 예를 들어 BM(PEO)₄-DM1을 첨가하고, 혼합하고, 약 1시간 동안 실온에서 정치하여 접합시키고 항체-약물 접합체를 형성할 수 있다. 접합체 혼합물을 젤 여과하고, 로딩하고, 하이트랩 S 칼럼을 통해 용리하여 잉여량의 약물-링커 중간체 및 다른 불순물을 제거할 수 있다.
- [0371] 시험관내 세포 증식 검정
- [0372] 일반적으로, 항체, 예를 들어 본 발명의 다중특이적 항체 또는 항체 유사체, 또는 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)의 세포독성 또는 세포증식억제 활성을 수용체 단백질, 예를 들어 HER2를 갖는 포유동물 세포를 세포 배양 배지 중에서 항체 또는 ADC에 노출시키고; 이 세포를 약 6시간 내지 약 5일의 기간 동안 배양하고; 세포 생존율을 측정함으로써 측정된다. 세포-기반 시험관내 검정을 사용하여 본 발명의 다중특이적 항체, 항체 유사체 및 ADC의 생존율 (증식), 세포독성, 및 아폽토시스의 유도 (카스파제 활성화)를 측정한다.
- [0373] 다중특이적 항체, 항체 유사체 및 ADC의 시험관내 효능은 세포 증식 검정에 의해 측정된다. 셀타이터-글로[®] 발광 세포 생존율 검정은 시판되고 있으며 (프로메가 코포레이션(Promega Corp.), 위스콘신주 매디슨), 콜레오프테라(Coleoptera) 루시페라제의 재조합 발현에 기초하는 균일한 검정 방법이다 (미국 특허 번호 5583024; 5674713 및 5700670). 이러한 세포 증식 검정은 대사적으로 활성인 세포의 지표인 ATP 존재량의 정량에 기초하여 배양물 중 살아있는 세포의 수를 결정한다 (문헌 [Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88]; US 6602677). 셀타이터-글로[®] 검정은 96웰 포맷으로 수행하여, 자동화 고처리량 스크리닝 (HTS)에 적용될 수 있게 한다 (문헌 [Cree et al. (1995) Ant iCancer Drugs 6:398-404]). 균일 검정 절차는 단일 시약 (셀타이터-글로[®] 시약)을 혈청이 보충된 배지 중에서 배양된 세포에 직접 첨가하는 것을 포함한다. 세포 세척, 배지 제거, 및 다중 피펫팅 단계는 필요하지 않다. 상기 시스템은 시약을 첨가하고 혼합한 후 10분 내에 384웰 포맷에서 겨우 15개 세포/웰에 불과한 것도 검출한다. 세포는 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 ADC로 계속적으로 처리될 수 있거나 또는 이들은 항체 또는 ADC로부터 처리 및 분리될 수 있다. 일반적으로, 간단하게, 즉 3시간 처리된 세포는 계속적으로 처리된 세포와 동일한 효능 효과를 나타낸다.
- [0374] 균일 "첨가-혼합-측정" 포맷은 세포를 용해하고 그에 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 신호를 생성시킨다.

ATP의 양은 배양물에 존재하는 세포의 개수에 직접적으로 비례한다. 셀타이터-글로[®] 검정은 루시페라제 반응에 의해 생성되는 "백열광-유형"의 발광 신호를 발생시키며, 그의 반감기는 일반적으로 사용된 세포 유형 및 배지에 따라 5시간이 넘는다. 살아있는 세포는 상대적 발광 단위 (RLU)에 반영된다. 기질인 딱정벌레 루시페린은 ATP를 AMP로 전환시킴과 동시에 광자를 생성하는 재조합 개똥벌레 루시페라제에 의해 산화적으로 탈카르복실화된다. 반감기의 연장은 시약 주입기를 사용할 필요성을 없애고, 다중 플레이트의 연속식 또는 배치식 조작에 대한 융통성을 제공한다. 이러한 세포 증식 검정을 각종 다중웰 포맷, 예를 들어 96 또는 384웰 포맷과 함께 사용할 수 있다. 데이터는 광도계측기 또는 CCD 카메라 영상화 장치로 기록될 수 있다. 발광 출력량은 시간에 따라 측정된 상대적인 광 단위 (RLU)로 제시된다. 대안적으로, 발광으로부터의 광자를 섭광제의 존재 하에 섭광 계수기에서 계수할 수 있다. 이후, 광 단위를 CPS (1초 당 계수)로서 표시할 수 있다.



[0375]

생체내 투여

[0377]

본 발명의 다중특이적 항체, 항체 유사체 및 항체-약물 접합체 (ADC)는 치료할 상태에 적절한 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 이러한 항체는 전형적으로 비경구, 즉 주입, 피하, 근육내, 정맥내, 피내, 경막내 및 경막 외로 투여될 것이다.

[0378]

제약 제제

[0379]

본 발명의 치료 다중특이적 항체, 항체 유사체 및 항체-약물 접합체 (ADC)의 제약 제제는 전형적으로 제약상 허용되는 비경구 비허클과 함께 단위 투여량 주사가능한 형태로의 비경구 투여, 즉 볼루스, 정맥내, 종양내 주사용으로 제조된다. 원하는 정도의 순도를 갖는 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 항체-약물 접합체 (ADC)는 임의로 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로, 제약상 허용되는 희석제, 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합된다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.]).

[0380]

허용되는 희석제, 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 히스티딘 및 상이한 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈 에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 3-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 칼레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/ 또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 동결건조된 항-ErbB2 항체 제제는 WO 97/04801에 기재되어 있고, 상기 문헌은 본원에 명백하게 참고로 포함된다.

[0381]

활성 제약 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드 성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 마크로에멀젼에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0382]

서방성 제제를 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예는 ADC를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 3773919), L-글루탐산 및 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 분해가능하지 않은 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해가능한 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)TM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

- [0383] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 하고, 이것은 멸균 여과 막을 통한 여과로 쉽게 수행된다.
- [0384] 제제는 상기 기재된 투여 경로에 적합한 것들을 포함한다. 제제는 편리하게는 단위 투여 형태로 제공될 수 있으며 제약 업계에 주지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 기술 및 제제에 대해서는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA)]에서 확인된다. 이러한 방법은 활성 성분을 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 활성 성분을 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 다와 균일하고 치밀하게 결합시키고, 이어서 필요한 경우, 생성물을 성형함으로써 제조된다.
- [0385] 본 발명의 수성 혼탁액은 활성 물질을 수성 혼탁액의 제조에 적합한 부형제와 혼합하여 함유한다. 이러한 부형제는 혼탁화제, 예컨대 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 크로스카르멜로스, 포비돈, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 알긴산나트륨, 폴리비닐파리돈, 트라카칸트 겹 및 아카시아 겹, 및 분산제 또는 습윤제, 예컨대 자연 발생 포스파티드 (예를 들어, 레시틴), 알킬렌 옥시드와 지방산의 축합 생성물 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트), 에틸렌 옥시드와 장쇄 지방족 알콜의 축합 생성물 (예를 들어, 헵타데카에틸렌옥시세탄올), 에틸렌 옥시드와 지방산 및 헥시톨 무수물 유래의 부분 에스테르의 축합 생성물 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트)을 포함한다. 수성 혼탁액은 또한 하나 이상의 보존제, 예컨대 에틸 또는 n-프로필 p-히드록시-벤조에이트, 하나 이상의 착색제, 하나 이상의 향미제 및 하나 이상의 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린을 함유할 수 있다.
- [0386] 제약 조성물은 멸균성 주사용 제제, 예를 들어 멸균성 주사용 수성 또는 유성 혼탁제의 형태일 수 있다. 상기 혼탁액은 상기 언급된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 바에 따라 제제화될 수 있다. 멸균 주사가능한 제제는 또한 비독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사가능한 용액 또는 혼탁액, 예컨대 1,3-부탄-디올 중의 용액일 수 있거나, 또는 동결건조된 분말로서 제조될 수 있다. 특히, 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매는 물, 립거액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 멸균 고정유가 용매 또는 혼탁 매질로서 통상적으로 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하는 임의의 배합 고정유가 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산을 마찬가지로 주사제의 제조에 사용할 수 있다.
- [0387] 담체 물질과 조합되어 단일 투여 형태를 생성할 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 숙주 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 정맥내 주입을 위해 의도된 수용액은 약 30 mL/시간의 속도의 적합한 부피의 주입이 일어날 수 있도록 하기 위해 용액 1 mL 당 활성 성분 약 3 내지 500 μ g을 함유할 수 있다.
- [0388] 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제제가 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사 용액, 및 혼탁화제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 혼탁액을 포함한다.
- [0389] 단백질 치료제를 경구 투여하는 것이 소화관에서의 가수분해 또는 변성으로 인해 선호되지 않긴 하지만, 경구 투여용으로 적합한 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 ADC는 별개의 단위, 예를 들어 예정량의 항체 또는 ADC를 각각 함유하는 캡슐, 카쉐 또는 정제로서 제조할 수 있다.
- [0390] 제제는 단위-투여 또는 다중-투여 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플 및 바이알에 포장될 수 있고, 사용 직전에 주사 를 위한 멸균 액체 담체, 예를 들어 물을 첨가할 것만이 요구되는 냉동-건조 (동결건조) 상태로 저장될 수 있다. 즉시투여용 주사 용액 및 혼탁액은 앞서 기재한 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조된다. 특정 단위 투여량 제제는 활성 성분을 본원에서 상기 언급한 바와 같은 1일 용량 또는 단위 1일 분할 용량 또는 그의 적절한 분획으로 함유하는 것이다.
- [0391] 또한, 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 활성 성분을 이를 위한 수의학적 담체와 함께 포함하는 수의학적 조성물을 제공한다. 수의학적 담체는 조성물 투여 목적에 유용한 물질이고, 불활성이거나 수의학 업계에서 허용되는 고체, 액체 또는 기체 물질일 수 있고, 활성 성분과 상용가능하다. 이러한 수의학적 조성물은 비경구, 경구 또는 임의의 상이한 바람직한 경로로 투여될 수 있다.
- [0392] 치료 용도
- [0393] 본원에 기재된 다중특이적 항체, 항체 유사체 및 ADC가 치료 용도를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 항체 및 항체 단편 및 항체-약물 접합체는 전암성 종양, 비전이성 종양 및 암성 종양 (예를 들어, 초기 암)을 포함하는 종양의 치료, 알레르기성 또는 염증성 장애의 치료, 자가면역 질환의 치료, 또는 암 (예를 들어, 유방

암, 결장직장암, 폐암, 신세포 암종, 신경교종, 또는 난소암), 알레르기성 또는 염증성 장애, 또는 자가면역 질환의 발병 위험성이 있는 대상체의 치료에 사용될 수 있다.

[0394] 용어 암은 전암성 성장, 양성 종양 및 악성 종양 (이에 제한되지 않음)을 포함하는 종식성 질환의 총체를 포함한다. 양성 종양은 발원 부위에 국한되어 유지되고 원위 부위로 침윤, 침습, 또는 전이하는 능력을 갖지 않는다. 악성 종양은 그 주변의 상이한 조직에 침습하여 손상시킬 것이다. 이들은 또한 일반적으로는 혈류를 통해 또는 림프절이 위치한 림프계를 통해 이들이 시작된 곳으로부터 분리되어 신체의 상이한 부위로 확산하는 (전이하는) 능력을 수득할 수 있다. 원발성 종양은 이들이 발생한 조직의 유형에 따라 분류되고, 전이성 종양은 암 세포가 유래된 조직의 유형에 따라 분류된다. 시간이 지남에 따라, 악성 종양 세포는 더욱 비정상적으로 되고 정상 세포와 달라진다. 암 세포의 외형에 있어서의 이러한 변화를 종양 등급이라 칭하며, 암 세포는 고분화성, 중간 분화성, 저분화성 또는 미분화성으로 기재된다. 고분화성 세포는 상당히 정상적인 외형을 나타내며 이들이 유래된 정상 세포와 유사하다. 미분화성 세포는 세포의 기원을 알 수 없을 정도로 매우 비정상적이 된 세포이다.

[0395] 종양은 고형 종양 또는 비-고형 또는 연부 조직 종양일 수 있다. 연부 조직 종양의 예는 백혈병 (예를 들어, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 성인 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 성숙 B-세포 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 전립프구성 백혈병 또는 모발상 세포 백혈병), 또는 림프종 (예를 들어, 비-호지킨 림프종, 피부 T-세포 림프종 또는 호지킨병)을 포함한다. 고형 종양은 혈액, 골수 또는 림프계 이외의 신체 조직의 임의의 암을 포함한다. 고형 종양은 상피 세포 기원의 것 및 비상피 세포 기원의 것으로 추가로 분리될 수 있다. 상피 세포 고형 종양의 예는 위장관, 결장, 유방, 전립선, 폐, 신장, 간, 췌장, 난소, 두경부, 구강, 위, 십이지장, 소장, 대장, 항문, 담낭, 음순, 비인두, 피부, 자궁, 남성 생식기관, 비뇨기관, 방광, 및 피부의 종양을 포함한다. 비상피 기원의 고형 종양은 육종, 뇌 종양 및 골 종양을 포함한다.

[0396] 상피암은 일반적으로 양성 종양에서 침습전 단계 (예를 들어, 계내 암종)로, 기저막을 침투하고 상피하 기질을 침습하는 악성 암으로 발전한다.

[0397] 다중특이적 항체, 항체 유사체 및 ADC는 또한 이러한 치료 용도에 사용될 수 있고, HER2에 결합한 항체는 특히 유방암, 결장직장암, 폐암, 신세포 암종, 신경교종 또는 난소암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0398] 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 후보자인 다른 대상체는 섬유혈관성 조직의 비정상적 증식, 장미 여드름, 후천성 면역 결핍증후군, 동맥 폐쇄, 아토피성 각막염, 박테리아 궤양, 베체트병, 혈액 매개 종양, 경동맥 폐쇄성 질환, 맥락막 신생혈관형성, 만성 염증, 만성 망막 박리, 만성 포도막염, 만성 유리체염, 콘택트렌즈 과도착용, 각막 이식편 거부, 각막 신생혈관형성, 각막 이식편 신생혈관형성, 크론병, 일스병, 유행성 각결막염, 진균 궤양, 단순 포진 감염, 대상 포진 감염, 고점성 증후군, 카포시 육종, 백혈병, 지질 변성, 라임병, 변연성 표피 박리, 무렌 궤양, 나병 이외의 미코박테리움 감염, 근시, 안구 신생혈관 질환, 시신경 유두소와, 오슬레-웨버 증후군 (오슬레-웨버-랑뒤)), 골관절염, 파제트병, 주변포도막염, 유천포창, 소수포증, 다발성 동맥염, 레이저 후 합병증, 원생동물 감염, 탄력 섬유 거짓 황색종, 익상편 건성 각막염, 방사상 각막절개술, 망막 신생혈관형성, 미숙아 망막병증, 수정체후 섬유증식증, 사르코이드, 공막염, 겹상 적혈구성 빈혈, 쇼그렌 증후군, 고형 종양, 스타르가트병, 스티븐 존슨병, 상부 변연성 각막염, 매독, 전신성 루푸스, 테리엔 변연성 변성, 특소플라스마증, 유잉 육종 종양, 신경모세포종 종양, 골육종 종양, 망막모세포종 종양, 횡문근육종 종양, 궤양성 결장염, 정맥 폐쇄, 비타민 A 결핍, 베게너 사르코이드증, 당뇨병과 연관된 바람직하지 않은 혈관신생, 기생충 질환, 비정상적 상처 치유, 수술, 손상 또는 외상 (예를 들어, 급성 폐 손상/ARDS) 후 비대증, 모발 성장 억제, 배란 및 황체 형성 억제, 착상 억제, 및 자궁 내 태아 발달 억제를 갖거나 이들의 발생할 위험이 있다.

[0399] 다중특이적 항체, 항체 유사체, 비스-Fab, ADC, 또는 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 임의의 다른 항체를 사용하여 치료될 수 있는 알레르기성 또는 염증성 장애 또는 자가면역 질환 또는 장애의 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 관절염 (류마티스 관절염, 예컨대 급성 관절염, 만성 류마티스 관절염, 통풍성 관절염, 급성 통풍성 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 감염성 관절염, 라임 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 척추 관절염, 및 소아-발병 류마티스 관절염, 골관절염, 만성 진행성 관절염, 변형성 관절염, 만성 원발성 다발성 관절염, 반응성 관절염, 및 강직성 척추염), 염증성 과다증식성 피부 질환, 건선, 예컨대 판상 건선, 적상 건선, 농포성 건선, 및 손톱 건선, 피부염, 예를 들어 접촉성 피부염, 만성 접촉성 피부염, 알레르기성 피부염, 알레르기성 접촉성 피부염, 포진성 피부염, 및 아토피성 피부염, x-연관 과다 IgM 증후군, 두드러기, 예컨대 만성 알레르기성 두드러기 및 만성 특발성 두드러기, 예를 들어 만성 자가면역 두드러기, 다발근염/피부근염, 소아 피부근염, 독성 표피 피사용해, 경피증 (예를 들어, 전신 경피증), 경화증, 예컨대 전신

경화증, 다발성 경화증 (MS), 예컨대 척수-눈 MS, 원발성 진행성 MS (PPMS), 및 재발 완화형 MS (RRMS), 진행성 전신 경화증, 아테롬성동맥경화증, 동맥경화증, 파종성 경화증, 및 실조성 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론병, 자가면역-매개 위장 질환, 결장염, 예컨대 궤양성 결장염, 궤양성 결장염, 현미경적 결장염, 콜라겐성 결장염, 폴립성 결장염, 괴사성 소장결장염, 및 경벽성 결장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 괴저농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 상공막염), 호흡 곤란 증후군, 예를 들어 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 수막염, 포도막의 전부 또는 일부의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액 장애, 류마티스 척추염, 돌발성 난청, IgE-매개 질환, 예컨대 과민증 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염, 예컨대 라스무센 뇌염 및 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예컨대 전방 포도막염, 급성 전방 포도막염, 육아종성 포도막염, 비육아종성 포도막염, 수정체 항원성 포도막염, 후방 포도막염, 또는 자가면역 포도막염, 신 증후군이 있거나 없는 사구체신염 (GN), 예컨대 만성 또는 급성 사구체신염, 예컨대 원발성 GN, 면역 매개 GN, 막성 GN (막성 신장병증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신장병증, 막- 또는 막성 증식성 GN (MPGN), 예를 들어 유형 I 및 유형 II, 및 급속 진행성 GN, 알레르기성 상태, 알레르기성 반응, 습진, 예를 들어 알레르기성 또는 아토피성 습진, 천식, 예컨대 기관지성 천식, 기관지 천식, 및 자가면역 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반하는 질환, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 또는 전신 홍반성 에리테마토데스, 예컨대 피부 SLE, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 파종상 홍반성 루푸스, 루푸스 (예를 들어, 신장염, 뇌염, 소아, 비신장, 신장외, 원반상, 탈모증), 소아 발병 (유형 I) 진성 당뇨병, 예를 들어 소아 인슐린-의존성 진성 당뇨병 (IDDM), 성인 발병 진성 당뇨병 (유형 II 당뇨병), 자가면역 당뇨병, 특발성 당뇨병 요붕증, 시토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 관련된 면역 반응, 결핵, 사르코이드증, 육아종증, 예를 들어 림프종모양 육아종증, 베게너 육아종증, 무과립구증, 혈관염 (예를 들어, 대혈관 혈관염 (예를 들어, 류마티스 다발성 및 거대세포 (타가야수) 동맥염), 중형 혈관 혈관염 (예를 들어, 가와사키병 및 다발성 결절 동맥염), 현미경적 다발성 동맥염, CNS 혈관염, 괴사, 피부, 또는 과민성 혈관염, 전신성 괴사 혈관염, 및 ANCA-관련 혈관염, 예컨대 쳐크-스트라우스 혈관염 또는 증후군 (CS S))을 포함하는 혈관염, 축두 동맥염, 재생불량성 빈혈, 자가면역 재생불량성 빈혈, 쿰즈 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 빈혈, 용혈성 빈혈 또는 면역 용혈성 빈혈, 예를 들어 자가면역 용혈성 빈혈 (AIHA), 악성 빈혈, 애디슨병, 진정 적혈구계 빈혈 또는 무형성 (PRCA), 인자 VIII 결핍증, A형 혈우병, 자가면역 호중구 감소증, 범혈구감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 혈구 누출을 수반하는 질환, CNS 염증성 질환, 다발성 장기 손상 증후군, 예컨대 패혈증, 외상 또는 출혈에 속발성인 질환, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기 신경염, 베체트 또는 베체트병, 캐슬만 증후군, 그래스터 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐스-존슨 증후군, 천포창, 예컨대 낙엽상 천포창 및 피부 유천포창, 천포창 (예를 들어, 심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 점막 유천포창 및 홍반 천포창), 자가면역 다발성 내분비 장애, 라이터병 또는 증후군, 면역 복합체 신장염, 항체-매개 신장염, 시신경척수염, 다발신경염, 만성 신경병증, 예컨대 IgM 다발신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 저혈소판증 (예를 들어, 심근경색 환자에 의해 발생), 예를 들어 혈전성 혈소판 감소성 자반병 (TTP) 및 자가면역 또는 면역-매개 저혈소판증, 예컨대 특발성 혈소판 감소성 자반병 (ITP), 예를 들어 만성 또는 급성 ITP, 정소 및 난소의 자가면역 질환, 예를 들어 자가면역 고환염 및 난소염, 원발성 갑상선 기능 저하증, 부갑상선 기능 저하증, 자가면역 내분비 질환, 예를 들어 갑상선염, 예를 들어 자가면역 갑상선염, 하시모토병, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염), 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선 기능 저하증, 그레이브스병, 다분비선 증후군, 예컨대 자가면역 다분비선 증후군 (또는 다분비선 내분비병증 증후군), 부신생물 증후군, 예를 들어 신경학적 부신생물 증후군, 예컨대 램버트-이튼 근무력증 증후군 또는 이튼-램버트 증후군, 강직 인간 증후군, 뇌척수염, 예컨대 알레르기성 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근무력증, 예컨대 흉선종-관련 중증 근무력증, 소뇌변성, 신경근강직증, 안전전 또는 안전전 근경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다초점 운동신경병증, 쉬한 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루푸스양 간염, 거대세포 간염, 만성 활성 간염 또는 자가면역 만성 활성 간염, 림프양 간질 폐렴, 폐쇄세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 베거병 (IgA 신장병증), 특발성 IgA 신장병증, 선상 IgA 피부병, 원발성 담관 경화증, 폐경화, 자가면역 장병증 증후군, 만성 소화장애증, 복강 질환, 비열대스프루 (글루텐 장병증), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭글로불린혈증, 근위축 축삭 경화증 (ALS; 루게릭병), 관상동맥 질환, 자가면역 귀 질환, 예컨대 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 청력 상실, 안전전 근경련 증후군 (OMS), 다발성 연골염, 예를 들어 불응성 또는 재발된 다발성 연골염, 폐포단백증, 아밀로이드증, 콩막염, 비암성 림프구증가증, 모노클로날 B 세포 림프구증가증 (예를 들어, 양성 모노클로날 감마글로불린병증 및 유의성 비결정 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS))을 포함하는 원발성 림프구증가증, 말초 신경병증, 부신생물 증후군, 채널병증, 예를 들어 간질, 편두통, 부정맥, 근육 질환, 난청, 실명, 주기적 마비, 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근염, 국소 분절 사구체 경화증 (FSGS), 내분비 눈병증, 포도망막염, 맥락망막염, 자가면역 간 장

애, 섬유다발성, 다발성 내분비 부전, 슈미트 증후군, 부신염, 위 위축, 초로 치매, 탈수초성 질환, 예를 들어 자가면역 탈수초성 질환, 당뇨성 신장병증, 드레슬러 증후군, 원형탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이노드 현상, 식도 운동이상, 손발가락경화증, 및 모세혈관확장증), 남성 및 여성 자가면역 불임, 혼합결합조직병, 샤가스병, 류마티스열, 습관성 유산, 농부폐, 다형성 홍반, 심장절개술후 증후군, 쿠싱 증후군, 새 사육가 폐, 알레르기성 육아종 혈관염, 양성 림프구 혈관염, 알포트 증후군, 폐포염, 예컨대 알레르기성 폐포염 및 섬유화 폐포염, 간질 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈만편모충증, 과동편모충증, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르 길루스증, 샘터 증후군, 카풀란 증후군, 뎅기, 심내막염, 심내막 심근섬유증, 미만성 간질성 폐섬유증, 간질 폐 섬유증, 특발성 폐섬유증, 낭성 섬유증, 안구내염, 장기 융기성 홍반, 태아적모구증, 호산구성 근막염, 술만 증후군, 펠티 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예컨대 만성 섬모체염, 이시성 섬모체염, 홍채섬모체염, 또는 푸크 섬모체염, 헤노호-웬라인 자색반, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머 병, 파보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신처리후 증후군, 선천성 풍진 감염, 앰스타인-바 바이러스 감염, 볼거리, 예반 증후군, 자가면역 생식선 부전, 시렌합 무도병, 연쇄상구균 감염후 신장염, 폐쇄성 혈전혈관염, 갑상선 기능 항진증, 척수매독, 맥락막염, 거대세포 다발성 근육통, 내분비 눈병증, 만성 과민성 폐렴, 건조 각막결막염, 유행성 각막결막염, 특발성 신장염 증후군, 미소 병변 신장병증, 양성 가족성 및 허혈-재관류 손상, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐쇄성 기도 질환, 규폐증, 아프타, 아프타 구내염, 동맥경화성 질환, 아스페리오게네스, 자가면역 용혈, 뷔크 병, 한랭글로불린혈증, 뒤피트렌 구축, 수정체 과민 안내염, 알레르기성 장염, 나병 결절성 홍반, 특발성 안면마비, 만성 폐로 증후군, 류마티스 열, 함만-리치병, 감각신경성 난청, 발작성 혈색소뇨증, 성선 기능저하증, 국한성 회장염, 백혈구 감소증, 전염 단핵구증, 횡단척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신장증, 교감성 안염, 육아종성 고환염, 췌장염, 급성 다발신경근염, 괴저농피증, 쿼베인 감상선염, 후천성 비장 위축, 항정자 항체에 의한 불임, 비-악성 흉선종, 백반증, SCID 및 앰스타인-바 바이러스-연관 질환, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 기생충 질환, 예컨대 리슈만편모충, 독성 쇼크 증후군, 식중독, T 세포 침윤, 백혈구-부착 결핍, 시토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 관련된 면역 반응, 백혈구 혈구 누출을 수반하는 질환, 다발성 장기 손상 증후군, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 알레르기 신경염, 자가면역 다발성 내분비 장애, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역 위축 위염, 교감성 안염, 류마티스병, 혼합결합조직 질환, 신 증후군, 췌도염, 다발성 내분비 부전, 말초 신경병증, 자가면역 다분비선 증후군 타입 I, 성인 발병 특발성 부갑상선 기능 저하증 (AOIH), 전체탈모증, 확장 심근병증, 후천적 수포성 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신 증후군, 원발성 경화담관염, 화농성 또는 비화농성 동염, 급성 또는 만성 동

염, 사골, 전두, 상악, 또는 접형동염, 호산구-관련 장애, 예컨대 호산구 증가증, 폐 침윤 호산구 증가증, 호산구 증가증-근육통 증후군, 로플러 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구 증가증, 기관지폐렴성 아스페르 길루스증, 아스페르 길루스증, 또는 호산구를 포함하는 육아종, 과민증, 음성혈청 척추관절염, 다발성 내분비 자가면역 질환, 경화담관염, 공막, 상공막, 만성 점막 폐부 칸디다증, 브루톤 증후군, 유아의 일과성 감마글로불린저혈증, 위스코트-올드리히 증후군, 운동실조 모세혈관확장증, 교원병과 연관된 자가면역 질환, 류마티스, 신경과 질환, 허혈 재관류 질환, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능이상, 혈관확장증, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각 과민, 뇌 허혈 및 신생혈관형성을 수반하는 질환, 알레르기성 과민성 질환, 사구체신염, 재관류 손상, 심근 또는 다른 조직의 재관류 손상, 급성 염증성 성분을 갖는 폐부병, 급성 화농성 수막염 또는 다른 중추신경계 염증성 질환, 안구 및 안와 염증성 장애, 과립구 수혈-연관 증후군, 시토카인 유발 독성, 급성 중증 염증, 만성 난치성 염증, 신우염, 폐경화, 당뇨성 망막병증, 당뇨성 대동맥 장애, 말단동맥 과다증식, 소화 궤양, 판막염 및 자궁내막증.

[0400] 치료 용도 뿐만 아니라, 본 발명의 항체는 진단 방법, 예컨대 본원에 기재된 질환 및 상태를 위한 진단 방법을 포함하여, 상이한 목적에 사용될 수 있다.

[0401] 조합 요법

[0402] 본 발명의 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 항체-약물 접합체 (ADC)는 예를 들어 항암 특성을 갖는 제2 화합물과 제약 조합 제제 내에 또는 조합 요법으로서 투약 처방으로 조합될 수 있다. 제약 조합 제제 또는 투약 처방의 제2 화합물은 바람직하게는 조합물의 항체 또는 ADC에 상보적인 활성을 가져서 서로 불리한 영향을 미치지 않는다.

[0403] 제2 화합물은 화학요법제, 세포독성제, 시토카인, 성장 억제제, 항호르몬제, 및/또는 심장보호제일 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다. 본 발명의 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 ADC를 함유하는 제약 조성물은 또한 치료 유효량의 화학요법제, 예컨대 튜불린-형성 억제제, 토포

이소미라제 억제제, DNA 결합제를 함유할 수 있다.

[0404] 다른 요법 처방은 항암제의 투여와 조합될 수 있다. 조합 요법은 동시 또는 순차 요법으로서 투여될 수 있다. 순차적으로 투여되는 경우, 조합물은 2회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용한 공동투여, 및 임의의 순서로의 연속 투여를 포함하고, 이때 바람직하게는 둘 다의 (또는 모든) 활성제가 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 일정 기간이 존재한다.

[0405] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 ADC로의 치료가 본원에서 확인된 항암제와, 하나 이상의 화학요법제 또는 성장 억제제의 조합 투여 (이에는 상이한 화학요법제의 각테일을 동시 투여하는 것이 포함됨)를 포함한다. 화학요법제에는 탁산 (예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및/또는 안트라시클린 항생제가 포함된다. 이러한 화학요법제에 대한 제조 및 투여 스케줄은 제조업체의 지침에 따라 또는 숙련된 전문가에 의해 실험적으로 결정된 바와 같이 사용될 수 있다. 이러한 화학요법에 대한 제조 및 투여 스케줄은 또한 문헌 ["Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md]에 기재되어 있다.

[0406] 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 ADC는 항호르몬 화합물, 예컨대 항에스트로겐 화합물, 예컨대 타목시펜; 항프로게스테론, 예컨대 오나프리스톤 (EP 616812); 또는 항안드로겐, 예를 들어 플루타미드와 이러한 분자에 대해 공지된 투여량으로 조합될 수 있다. 치료할 암이 호르몬에 의존적이지 않은 암인 경우에는, 환자에게 이미 항호르몬 요법을 실시했을 수 있고, 암이 호르몬에 의존적이지 않게 된 후에 항체 또는 ADC (및 임의로는 본원에 기재된 바와 같은 상이한 작용제)를 상기 환자에게 투여할 수 있다. 또한, 심장보호제 (상기 요법과 관련이 있는 심근 기능이상을 예방하거나 저하시키기 위함) 또는 1종 이상의 시토카인을 상기 환자에게 동시 투여하는 것이 유익할 수 있다. 상기 치료 요법 이외에도, 환자에게 암 세포의 수술적 제거 및/또는 방사선 요법을 실시할 수 있다.

[0407] 상기한 공동투여되는 작용제 중 임의의 것에 대한 적합한 투여량은 현재 이용되고 있는 것이며, 새로 확인된 작용제 및 다른 화학요법제 또는 치료제의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 감량될 수 있다.

[0408] 조합 요법은 "상승작용"을 제공해줄 수 있고, "상승작용적"인 것으로 입증되었는데, 즉 활성 성분들을 함께 사용한 경우에 달성된 효과는 화합물을 개별적으로 사용하여 얻은 효과들의 합 보다 크다. 상승작용 효과는 활성 성분들이 (1) 공동-제제화되어 투여되거나 조합된 단위 투여 제제 중에서 동시에 전달되는 경우, (2) 별개의 제제로서 교대로 전달되거나 동시에 전달되는 경우, 또는 (3) 일부 다른 방식으로 전달되는 경우에 달성될 수 있다. 교대 요법으로 전달되는 경우의 상승작용적 효과는 화합물들이 순차적으로 투여되거나 전달되는 경우, 예를 들어 별개의 시린지에서 상이한 주사로 순차적으로 투여되거나 전달되는 경우에 달성될 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안에는 유효 투여량의 각 활성 성분이 순차적으로, 즉 연속적으로 투여되지만, 조합 요법에서는 유효 투여량의 2종 이상의 활성 성분들이 함께 투여된다.

[0409] 특정의 예시적인 표적 분자

[0410] 본 발명의 다중특이적 항체 및 항체 유사체에 의해 표적화될 수 있는 분자의 예는 가용성 혈청 단백질 및 이들의 수용체, 및 다른 막 결합된 단백질 (예를 들어, 어드헤신)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0411] 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 유사체는 하기로부터 선택된 하나의 시토카인, 시토카인-관련 단백질 및 시토카인 수용체에 결합할 수 있고, 본 발명의 다중특이적 항체는 하기로부터 선택된 1개, 2개 또는 그 초과의 시토카인, 시토카인-관련 단백질 및 시토카인 수용체에 결합할 수 있다: BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNB1, IFNG, IFNW1, FEL1, FEL1 (EPSELON), FEL1 (ZETA), IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, PDGFA, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, LTA (TNF-b), LTB, TNF (TNF-a), TNFSF4 (OX40 리간드), TNFSF5 (CD40 리간드), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27 리간드), TNFSF8 (CD30 리간드), TNFSF9 (4-1BB 리간드), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (아프릴), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, HGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, IL1R1, IL1R2, IL1RL1, LL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (렙틴),

PTN, 및 THPO.

[0412] 또 다른 실시양태에서, 표적 분자는 하기로부터 선택된 케모카인, 케모카인 수용체 또는 케모카인-관련 단백질이다: CCL1 (I-309), CCL2 (MCP-1/MCAF), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCLH (에오타신), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MDP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC/액소두스-2), CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/에오타신-2), CCL25 (TECK), CCL26 (에오타신-3), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GR03), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYD1), SCYE1, XCL1 (림포탁틴), XCL2 (SCM-1b), BLR1 (MDR15), CCBP2 (D6/JAB61), CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-1RB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5/CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (Tymstr/STRL33/본조), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HDF1A, DL8, PRL, RGS3, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2, 및 VHL.

[0413] 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 유사체는 하기로부터 선택된 하나의 표적에 결합할 수 있고, 본 발명의 다른 특이적 항체를 하기로부터 선택된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다: ABCF1; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVRL1; ADORA2A; Aggrecan; AGR2; AICDA; AIF1; AIG1; AKAP1; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPT1; ANGPT2; ANGPT3; ANGPT4; ANPEP; APC; APOC1; AR; AZGP1 (아연-a-당단백질); B7.1; B7.2; BAD; BAFF (BLys); BAG1; BAI1; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLR1 (MDR15); BMP1; BMP2; BMP3B (GDF10); BMP4; BMP6; BMP8; BMPR1A; BMPR1B; BMPR2; BPAG1 (플렉틴); BR3; BRCA1; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CANT1; CASP1; CASP4; CAV1; CCBP2 (D6/JAB61); CCL1 (I-309); CCL11 (에오타신); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP-1d); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3b); CCL2 (MCP-1); MCAF; CCL20 (MIP-3a); CCL21 (MTP-2); SLC; 액소두스-2; CCL22 (MDC/STC-1); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2/에오타신-2); CCL25 (TECK); CCL26 (에오타신-3); CCL27 (CTACK/ILC); CCL28; CCL3 (MTP-1a); CCL4 (MDP-1b); CCL5 (RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1 (CKR1/HM145); CCR2 (mcp-1RB/RA); CCR3 (CKR3/CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5/ChemR13); CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6); CCR7 (CKR7/EBI1); CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHK1); CCRL2 (L-CCR); CD164; CD19; CD1C; CD20; CD180 (RP105); CD200; CD307 (FcRH5); CD22; CD24; CD28; CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD52; CD69; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CDH1 (E-카드헤린); CDH10; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A (p21Wapl/Cip1); CDKN1B (p27Kip1); CDKN1C; CDKN2A (P16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; 키티나제; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (클라우딘-7); CLN3; CLU (클러스테린); CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (GCSF); CTLA4; CTNNB1 (b-카테닌); CTSB (카텝신 B); CX3CL1 (SCYD1); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC/IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GR03); CXCL5 (ENA-78/LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (Tymstr/STRL33/본조); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FcRH1; FcRH2; FCRL4; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD); FEL1 (EPSILON); FIL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (파브로넥틴); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-I); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GFI1; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (겔소린); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HDP1; 히스타민 및 히스타민 수용체; HLA-A; HLA-DOB; HLA-DRA; HM74; HMOX1; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN감마; DFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7;

IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2; IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (당단백질 130); EL7; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAKI; ERAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6 인테그린); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b4 인테그린); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GC Box BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (케라틴 19); KRT2A; KHTHB6 (모발-특이적 유형 H 케라틴); LAMAS; LEP (렙틴); 링고-p75; 링고-트로이; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG 또는 Omgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; 미드카인; MEF; MIP-2; MKI67; (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (메탈로티오넥틴-III); MTSS1; MUC1 (뮤신); MYC; MYD88; NAG14; NCK2; 뉴로칸; NFkB1; NFkB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR-링고; NgR-Nogo66 (Nogo); NgR-p75; NgR-트로이; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NROB1; NROB2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR1I2; NR1I3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; OZD1; OPRD1; P2RX5; P2RX7; PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; PDGFA; PDGFB; PECAMI; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; 포스파칸; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PR1; PRKCQ; PRKD1; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21Rac2); RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNFI10 (ZNF144); ROBO2; S100A2; SCGB1D2 (리포필린 B); SCGB2A1 (마마글로빈2); SCGB2A2 (마마글로빈 1); SCYE1 (내피 단핵구-활성화 시토카인); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERP1NB5 (맵신); SERPINE1 (PAI-1); SERPDMF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B (Spr1); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCP10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFB1; TGFB1I1; TGFB2; TGFB3; TGFB1; TGFBR1; TGFBR2; TGFBR3; TH1L; THBS1 (트롬보스폰딘-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TMP3; 조직 인자; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-a; TNFAEP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSF11A; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFRSF10 (TRAIL); TNFSF1 1 (TRANCE); TNFSF12 (APO3L); TNFSF13 (아프릴); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15 (VEGI); TNFSF18; TNFSF4 (OX40 리간드); TNFSF5 (CD40 리간드); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (CD27 리간드); TNFSF8 (CD30 리간드); TNFSF9 (4-1BB 리간드); TOLLIP; 톨-유사 수용체; TOP2A (토포이소마라제 Ea); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VEGF; VEGFB; VEGFC; 베르시칸; VHL C5; VLA-4; XCL1 (림포탁틴); XCL2 (SCM-1b); XCR1(GPR5/CCXCR1); YY1; 및 ZFPM2.

[0414]

특정 실시양태에서, 본 발명에 의해 포함되는 항체에 대한 하나 이상의 문자 표적 분자는 CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD34, CD64, CD79A, CD79B, CD180 (RP105), CD200 및 CD307 (FcRH5)로부터 선택된 CD 단백질; EGF 수용체 (HER1), HER2, HER3 또는 HER4 수용체로부터 선택된 ErbB 수용체 패밀리의 구성원; LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, 알파4/베타7 인테그린, 및 알파v/베타3 인테그린 (그의 알파 또는 베타 서브유닛 (예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체) 포함)으로부터 선택된 세포 부착 분자; VEGF-A, VEGF-C로부터 선택된 성장 인자; 조직 인자 (TF); 알파 인터페론 (알파IFN); TNF알파, IL-1베타, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL17A/F, IL-18, IL-13R알파1, IL13R알파2, IL-4R, IL-5R, IL-9R, IgE로부터 선택된 인터류킨; 혈액형 항원; f1k2/f1t3 수용체; 비만 (OB) 수용체; mp1 수용체; CTLA-4; RANKL, RANK, RSV F 단백질, 단백질 C를 포함한다.

[0415]

WO 96/16673은 이중특이적 항-ErbB2/항-Fc γ RIII 항체를 기재하고, 미국 특허 번호 5,837,234는 이중특이적 항-ErbB2/항-Fc γ RI 항체를 개시한다. 이중특이적 항-ErbB2/Fc α 항체는 WO98/02463에 제시되어 있다. 미국 특허 번호 5,821,337 및 6,407,213은 이중특이적 항-ErbB2/항-CD3 항체를 교시한다. CD3 항원 상의 에피토프 및 제2 에피토프에 결합하는 추가의 이중특이적 항체가 기재되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,078,998 (항-CD3/종양 세포 항원); 5,601,819 (항-CD3/IL-2R; 항-CD3/CD28; 항-CD3/CD45); 6,129,914 (항-CD3/악성 B 세포 항원); 7,112,324 (항-CD3/CD19); 6,723,538 (항-CD3/CCR5); 7,235,641 (항-CD3/EpCAM); 7,262,276 (항-CD3/난소 종양 항원); 및 5,731,168 (항-CD3/CD4IgG)을 참조한다.

[0416]

한 실시양태에서, 본 발명의 다중특이적 항체는 IL-1알파 및 IL-1베타, IL-12 및 IL-18; IL-13 및 IL-9; IL-13 및 IL-4; IL-13 및 IL-5; IL-5 및 IL-4; IL-13 및 IL-1베타; IL-13 및 IL-25; IL-13 및 TARC; IL-13 및 MDC; IL-13 및 MEF; IL-13 및 TGF-β; IL-13 및 LHR 효능제; IL-12 및 TWEAK, IL-13 및 CL25; IL-13 및 SPRR2a; IL-13 및 SPRR2b; IL-13 및 ADAM8, IL-13 및 PED2, IL17A 및 IL17F, CD3 및 CD19, CD138 및 CD20; CD138 및 CD40; CD19 및 CD20; CD20 및 CD3; CD38 및 CD138; CD38 및 CD20; CD38 및 CD40; CD40 및 CD20; CD-8 및 IL-6; CD20 및 BR3, TNF알파 및 TGF-베타, TNF알파 및 IL-1베타; TNF알파 및 IL-2, TNF 알파 및 IL-3, TNF알파 및

IL-4, TNF알파 및 IL-5, TNF알파 및 IL6, TNF알파 및 IL8, TNF알파 및 IL-9, TNF알파 및 IL-10, TNF알파 및 IL-11, TNF알파 및 IL-12, TNF알파 및 IL-13, TNF알파 및 IL-14, TNF알파 및 IL-15, TNF알파 및 IL-16, TNF알파 및 IL-17, TNF알파 및 IL-18, TNF알파 및 IL-19, TNF알파 및 IL-20, TNF알파 및 IL-23, TNF알파 및 IFN알파, TNF알파 및 CD4, TNF알파 및 VEGF, TNF알파 및 MIF, TNF알파 및 ICAM-1, TNF알파 및 PGE4, TNF알파 및 PEG2, TNF알파 및 RANK 리간드, TNF알파 및 Te38; TNF알파 및 BAFF; TNF알파 및 CD22; TNF알파 및 CTLA-4; TNF알파 및 GP130; TNF α 및 IL-12p40; VEGF 및 HER2, VEGF-A 및 HER2, VEGF-A 및 PDGF, HER1 및 HER2, VEGF-A 및 VEGF-C, VEGF-C 및 VEGF-D, HER2 및 DR5, VEGF 및 IL-8, VEGF 및 MET, VEGFR 및 MET 수용체, VEGFR 및 EGFR, HER2 및 CD64, HER2 및 CD3, HER2 및 CD16, HER2 및 HER3; EGFR(HER1) 및 HER2, EGFR 및 HER3, EGFR 및 HER4, IL-13 및 CD40L, IL4 및 CD40L, TNFR1 및 IL-1R, TNFR1 및 IL-6R 및 TNFR1 및 IL-18R, EpCAM 및 CD3, MAPG 및 CD28, EGFR 및 CD64, CSPG 및 RGM A; CTLA-4 및 BTNO2; IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및 Erb2B; MAG 및 RGM A; NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; OMgp 및 RGM A; PDL-I 및 CTLA-4; 및 RGM A 및 RGM B로부터 선택된 적어도 2개의 표적 분자에 결합한다.

[0417] 한 실시양태에서, 본 발명의 다중특이적 항체는 CD3, 및 BLR1, BR3, CD19, CD20, CD22, CD72, CD79A, CD79B, CD180 (RP105), CR2, FcRH1, FcRH2, FcRH5, FCER2, FCRL4, HLA-DOB 및 NAG14로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 표적 분자에 결합한다.

[0418] 가용성 항원 또는 그의 단편 (임의로 또 다른 분자에 접합됨)이 항체를 생성시키기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막횡단 분자, 예컨대 수용체의 경우에는, 그의 단편 (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막횡단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예를 들어, 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막횡단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다. 항체의 제조에 유용한 상이한 항원 및 그의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.

항체-약물 접합체의 대사율

[0420] 선행 기술에 비해 신규하고 진보성을 갖는 정도라면, 본원에 기재된 ADC 화합물의 생체내 대사 산물 역시 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이러한 생성물은 예를 들어 투여된 화합물의 산화, 환원, 가수분해, 아미드화, 에스테르화, 효소적 철단 등으로 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물을 그의 대사 산물 생성에 충분한 시간 동안 포유동물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된 신규하고 진보성을 갖는 화합물을 포함한다.

[0421] 대사물은 전형적으로 방사성 표지된 (예를 들어, ^{14}C 또는 ^3H) ADC를 제조하고, 이를 래트, 마우스, 기니아피그, 원숭이와 같은 동물 또는 인간에게 검출 가능한 용량 (예를 들어, 약 0.5 mg/kg 초과의 용량)으로 비경구 투여하며, 대사가 일어나기에 충분한 시간(전형적으로 약 30초 내지 30시간)이 경과한 후, 그의 전환 생성물을 뇨, 혈액 또는 다른 생물학적 샘플로부터 단리시킴으로써 확인된다. 이러한 생성물은 표지되었기 때문에 용이하게 단리된다 (다른 것들은 대사물 중에 유지되는 에피토프에 결합할 수 있는 항체를 사용하여 단리됨). 대사물 구조는 통상적인 방식, 예를 들어 MS, LC/MS 또는 NMR 분석으로 결정된다. 일반적으로, 대사물의 분석은 당업자에게 주지되어 있는 통상적인 약물 대사 연구와 동일한 방식으로 수행된다. 전환 생성물은 생체내에서 발견되지 않는 한, 본 발명의 ADC 화합물의 치료 투여를 위한 진단 분석에 유용하다.

영상화 방법

[0423] 다른 실시양태에서, 다중특이적 항체 또는 항체 유사체는 방사성핵종, 형광 염료, 생체발광-촉발 기질 모이어티, 화학발광-촉발 기질 모이어티, 효소, 및 진단, 약동학 및 치료적 적용을 이용하는 영상화 실험을 위한 상이한 검출 표지를 갖는 반응성 티올을 통해 표지될 수 있다. 일반적으로, 표지된 다중특이적 항체 또는 표지된 항체 유사체, 즉 "바이오마커" 또는 "프로브"는 살아있는 유기체, 예를 들어 인간, 설치류, 또는 다른 작은 동물, 관류된 기관, 또는 조직 샘플에 주사, 관류, 또는 경구 섭취에 의해 투여된다. 프로브의 분포를 시간 경로에 걸쳐 검출하고, 영상으로 나타낸다.

제조품

[0425] 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 장애의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조품 또는 "키트"가 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지, 블리스터 팩 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 용기는 상태의 치료에 효과적인 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 ADC 조성물을 보유하고, 멀

균 입구를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있음). 조성물의 적어도 하나의 활성제는 다중특이적 항체, 항체 유사체 또는 ADC이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 상태, 예컨대 암의 치료에 사용된다는 것을 표시한다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 주사용 정균수 (BWF), 포스페이트 완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 더 포함할 수 있다. 제조품은 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하여, 상업용 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 더 포함할 수 있다.

[0426] 실시예

[0427] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 다양한 상이한 실시양태가 실시될 수 있는 것으로 이해되며, 일반적인 설명은 상기 제공되었다.

[0428] 실시예 1 - 티오-Fab 및 힌지-cys-Fab의 제조, 단백질 생성, 및 이중특이적 비스-Fab의 합성

[0429] 티오-Fab 및 힌지-cys-Fab의 제조

[0430] 여러 접근법을 이용하여 이후의 반응에 사용하기 위한 유리 슬프히드릴 기를 갖는 항체 단편을 생성하였다. 한 접근법에서, 시스테인 치환을 부위-지정 돌연변이유발에 의해 경쇄 또는 중쇄의 불변 도메인의 다양한 위치에서 항체 구축물에 도입하여, 문헌 [Junutula, et al. J Immunol Methods 332(1-2): 41-52 (2008)]에 이전에 기재된 바와 같은 티오-Mab을 생성하였다. 티오-Fab은 티오-Mab을 25 mM 트리스, pH 8.0에서 1 mg/mL로 희석하고, Lys-C (와코 케미칼스 유에스에이, 인크.(Wako Chemicals USA, Inc.), 베지니아주 리치몬드)를 사용하여 효소 대 항체의 1:1000 (wt:wt) 비에서 1시간 동안 37°C에서 효소에 의해 소화시킴으로써 티오-Mab으로부터 효소적으로 생성하였다. Lys-C 소화를 5 μM의 프로테아제 억제제 토실-L-리신 클로로메틸 케톤 (TLCK) (바켐(Bachem), 캘리포니아주 토렌스)을 사용하여 중단시키고, 5 mL 하이-트랩(Hi-Trap) SP FF 칼럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare), 뉴저지주 피스카타웨이) 상에서 50 mM 아세트산나트륨 완충제 및 0-300 mM NaCl 10 CV 구배를 사용하는 양이온 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 이 방법에 의해 생성된 티오-Fab은 때때로 본원에서 "효소 티오-Fab"으로 지칭된다. 또 다른 접근법에서, 조작된 cys 잔기를 갖는 Fab을 코딩하는 DNA 구축물 또는 힌지 영역에 하나의 천연 cys 잔기를 함유하는 중쇄 단편을 코딩하는 DNA 구축물을 플라스미드 발현 벡터에 서브클로닝하고, 이. 콜라이에서 직접 발현시켰다. 이 방법에 의해 생성된 티오-Fab은 때때로 본원에서 "제조합 티오-Fab"으로 지칭된다. 제3 접근법은 조작된 cys 잔기가 결여된 항체에 대해 사용하였고, 이는 IgG의 힌지 영역에 존재하는 천연 cys 잔기(들)에 의존하였다. 이 방법을 이용하여 "힌지-cys-Fab"을 생성하였고, 아래 보다 상세하게 기재하였다.

[0431] 합성 반응에 사용하기 위한 조작된 시스테인을 함유하지 않는 천연 항체로부터 힌지-cys-Fab을 제조하기 위해, 본 발명자들은 하기 효소적 절차를 이용하였다. 하기 절차를 트拉斯투주맙에 대해 이용하는 동안, 이 절차는 일반적으로 임의의 IgG에 적용가능하다. 트拉斯투주맙은 pH 4.5의 아세트산나트륨 완충제에서 펩신 (1% w/w)으로 처리함으로써 소화시켰다. 1시간 동안 소화시킨 후에, F(ab')2를 SP-HP 양이온 교환 수지 상에서 포획하여 소화 혼합물로부터 단리하고, 0-1 M NaCl의 10 CV 염 구배에 의해 정제하였다. 이어서, F(ab')2를 25 mM MES, pH 5.8, 2 mM EDTA 및 300 mM NaCl을 함유하는 완충제에서 환원시켰다. 1 mM TCEP로 환원시킨 후에, Fab을 5 mM DHAA의 첨가에 의해 산화시켜 중쇄와 경쇄 사이에 디슬피드를 재형성시켰다. 본 발명자들은 일상적으로 이들 반응 조건하에서 오직 중쇄와 경쇄 사이에 디슬피드가 재형성되며, 힌지 영역 내 2개의 시스테인 잔기가 산화되지 않은 상태로 남아있다는 것을 관찰하였다.

[0432] 이어서, 힌지에서 2개의 유리 티올 (cys 잔기)을 1 몰 당량의 N-에틸말레이미드 (NEM) (시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 미주리주 세인트 루이스)와 반응시켰다. 이어서, 단일-변형된, 이중-변형된 및 변형되지 않은 Fab을 함유하는 생성된 혼합물을 과량의 비스-말레이미도 가교제와 반응시켰다. 이들 반응 조건은 3가지 생성물을 생성하였다: 하나의 가교제 및 하나의 NEM을 갖는 Fab, 2개의 NEM을 갖는 Fab 및 오직 하나의 가교제를 함유하는 Fab. 오직 하나의 가교제를 함유하는 Fab은 유리 시스테인을 갖지 않는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이들 반응 조건하에서, 단일 가교제가 두 시스테인과 매우 효율적으로 반응하여, 시스테인이 가교제에 의해 고리화된 분자가 생성되었다. 상기 3가지 반응 생성물을 포함하는 물질을 겔 여과에 의해 반응 혼합물로부터 정제하고 (원하지 않는 반응 성분을 제거하기 위함), 이를 유사한 방식으로 제조된 상이한 힌지-cys-Fab 또는 티오-Fab에 커플링시키는데 사용하였다. 기재된 바와 같이 제조되고, 하나의 가교제, 하나의 유리-말레이미도 및 하나의 유리 슬프히드릴을 함유하는 힌지-cys-Fab 또는 티오-Fab만이 아래 상세하게 기재되는 비스-Fab 합성 반응에서 반응 할 수 있었다.

[0433]

단백질 발현 및 정제

[0434]

이. 콜라이에서의 단백질 발현을 이전에 기재된 바와 같이 진탕 플라스크 또는 10-리터 발효조에서 밤새 배양함으로써 수행하였다. 예를 들어, 문헌 [Carter, et al., Biotechnology (N Y) 10(2): 163-7 (1992)]; [Simmons, et al., J Immunol Methods 263(1-2): 133-47 (2002)]을 참조한다. 반응성 시스테인 잔기 (hu4D5-티오-Mab)를 함유하도록 조작된 트拉斯투주맙 (전장 헤르셉틴®)의 경우에, 문헌 [Junutula, et al. J Immunol Methods 332(1-2): 41-52 (2008)]에 기재된 바와 같이 항체를 발현시켜 정제하였다. 재조합 티오-Fab 또는 재조합 헌지-cys-Fab을 발현하는 이. 콜라이 세포 펠릿을 25 mM 트리스, pH 7.5, 125 mM NaCl, 5 mM EDTA를 함유하는 완충제 (TEB)에 재현탁시키고, 마이크로플루이다이저를 이용하여 용해시켰다. 추출물을 교반하면서 1시간 동안 pH 9.0로 조정된 응결 폴리에틸렌이민 (0.4%)으로 처리한 후에 45분 동안 15,000 x g에서 원심분리하였다. 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab을 단백질 G 및 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하는 당업계에 공지된 표준 절차에 의해 정제하였다. 특히, 상청액을 0.22 μ m 필터를 통해 여과한 후에, 단백질 G 수지, 전형적으로 하이-트랩 단백질 G (지이 헬스케어, 뉴저지주 피스카타웨이)에 적용하였다. 0.2 M 아세트산으로 용리한 후에 SP-HP 양이온 교환 수지 (지이 헬스케어, 뉴저지주 피스카타웨이)로 포획하였다. 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab을 0-1 M NaCl의 10 CV 구배로 용리하였다. 정제된 티오-Fab을 SDS-PAGE 및 질량 분광분석법에 의해 특성화하였다. 이들 특성화는 종종 275 Da 및 306 Da의 질량 증가를 나타내었다. 이러한 질량 증가물은 비스-말레이미드와의 가교를 위한 티오-Fab을 제조하기 위해 환원 및 산화에 의해 제거되는 쌍을 형성하지 않은 시스테인 상의 디술피드 부가물인 것으로 밝혀졌다. 티오-Fab의 환원 및 산화는 다음과 같이 수행하였다. 우선, 티오-Fab을 25 mM MES, pH 5.8, 300 mM NaCl 및 5 mM EDTA를 함유하는 완충제 중에서 2 mM 트리(2-카르복시에틸) 포스핀 HCl (TCEP-HCl; 또한 TCEP로 지칭됨) (피어스(Pierce) [써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)]), 일리노이주 록포드)을 첨가하여 24시간 동안 환원시켰다. 환원 후에, 단백질을 5 mM 데히드로아스코르브산 (DHAA) (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스)을 첨가하여 환원시켰다. 단리된 티오-Fab을 SDS-PAGE 및 질량 분광분석법에 의해 분석하여 적절하게 환원 및 산화된 단백질을 확인하였다.

[0435]

비스-Fab 합성

[0436]

도 1은 비스-Fab의 합성을 위한 반응식을 보여준다. 비스-Fab 합성의 제1 단계에서, 쌍을 형성하지 않은 시스테인을 갖는 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab을 사용하였다. 일반적으로, 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab은 환원 및 산화를 수행하는 동일한 완충제 (MES, pH 5.8, 2 mM EDTA 및 300 mM NaCl) 중에서 1 mg/mL의 단백질 농도였다 (도 1, 패널 1). 이 단계에는 2가지 잠재적인 원하지 않은 반응 생성물인 디술피드 이량체 및 가교된 이량체가 존재하였다. 본 발명자들은 합성의 상기 단계에서 1 mg/mL의 단백질 농도가 반응의 중요한 특징이며, 이는 이량체화가 상기 단백질 농도에서 최소화되기 때문이라는 것을 발견하였다. 또한, EDTA가 포함된 낮은 pH 완충제를 사용하여 반응을 제어하는 것이 이량체화를 최소화하는데 도움이 되었다. 5-배 과량의 비스-말레이미도 가교제 (콴타 바이오디자인(Quanta BioDesign), 오하이오주 파웰)를 반응 혼합물에 첨가하였다 (도 1, 패널 2). 이 5-배 과량의 가교제가 또한 원하지 않는 이량체화를 최소화하는데 도움이 되었다. 반응이 완료될 때까지 실온 (RT) 또는 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 혼합물을 젤 여과에 적합한 부피로 농축하였다 (도 1, 패널 3). 본 발명자들은 전형적으로 μ g 내지 mg 양의 합성을 위해 22 mL S-200 트리콘(Tricorn) 칼럼 (지이 헬스케어, 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하였다. 이러한 제1 젤 여과 단계는 사용되지 않은 가교제를 제거하여 가교제에 접한된 정제된 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab을 생성하였다. 상기 기재된 조건은 전형적으로 적어도 90% 또는 그 초과의 원하는 생성물을 생성하였다. 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab은 유리-티울로 남아있지 않고, 모두 가교제에 접합되거나 또는 쌍을 형성하지 않은 시스테인을 통해 또 다른 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab에 디술피드에 의해 결합되었다.

[0437]

이어서, 가교제 종이 추가된 단리된 및 정제된 티오-Fab (또는 헌지-cys-Fab)를 제2 티오-Fab (또는 헌지-cys-Fab)에 첨가하고, 5 mg/mL 이상으로, 일반적으로 젤 여과에 적합한 부피로 농축하였다 (도 1, 패널 4). 본 발명자들은 합성의 상기 단계에서 적어도 5 mg/mL의 단백질 농도가 반응을 완료시키는데 중요하다는 것을 발견하였다. 보다 낮은 단백질 농도는 단기 소량의 가교된 비스-Fab 이량체가 형성되도록 하였다. 이론에 얹매이지 않고, 본 발명자들은 가교된 비스-Fab 이량체의 형성을 방해하는 입체 효과 또는 점도 관련 변수가 반응물의 농도를 증가시켜 극복된다고 가정하였다. 또한, 본 발명자들은 65 mg/mL을 포함하여 65 mg/mL까지의 단백질 농도의 범위를 시험하였다. 본 발명자들은 단백질 농도가 높을수록 반응이 보다 빠르게 완료된다는 단백질 농도와 반응 시간 사이의 상관관계를 발견하였다 (데이터는 나타내지 않음). RT 또는 37°C에서 2-24시간 후에, 질량 분광분석법에 의해 결정된 바와 같이 반응이 완료되었다 (도 1, 패널 4). 일반적으로, 한 시약이 최종 혼합물에서 잉여량이 존재하고 커플링되지 않은 상태로 남아있었다. 완료된 반응물을 다시 젤 여과에 의해 정제하고;

이번에 본 발명자들은 유리 시스테인 아미노산을 통해 (티오-Fab의 경우) 또는 헌지 영역에 위치한 쌍을 형성하지 않은 시스테인을 통해 (조작되지 않은 헌지-cys-Fab의 경우) 비가역적으로 가교된 100 kD 비스-Fab을 함유하는 이량체 피크를 수집하였다 (도 1, 패널 4). 두 단계 동안 반응 진행을 종종 질량 분광분석법에 의해 모니터링하였고, 이는 두 반응물의 존재 및 비스-Fab 생성물의 형성을 명확하게 나타내었다 (도 1, 패널 4). 제2 젤 여과후 원하는 생성물의 순도를 질량 분광분석법 및 SDS-PAGE에 의해 결정하였다. 환원 및 SDS-PAGE 분석시, 비가역적 가교가 비활원성 가교된 쇄를 나타내는 50 kD 밴드의 존재에 의해 판찰되었다 (도 1, 패널 5). 소규모의 상기 기재된 과정을 이용하여, 본 발명자들은 전형적으로 마이크로그램 양의 출발 물질로 마이크로그램 수율을 달성하였다. 또한, 보다 큰 규모에서, 본 발명자들은 전형적으로 밀리그램 양의 출발 물질로부터 밀리그램 수율을 달성하였다.

[0438] 실시예 2 - Her2 및 Her1을 표적화하는 비스-Fab의 합성 및 비스-Fab 시험관내 생물학적 활성의 분석

[0439] 비스-Fab의 다양한 생물학적 활성을 연구하기 위해, 본 발명자들은 Her 축의 성분, 특히 Her2 및 Her1을 표적화하는 비스-Fab을 합성하였다. 암 세포를 성장시키는데 있어 Her 축의 중요성은 잘 문서화되어 있고, 다양한 강력한 억제 항체가 용이하게 이용이 가능하다. 예를 들어, 문헌 [Kumar, R. et al., Semin Oncol 27(6 Suppl 11):84-91; discussion at 92-100 (2000)]; [Yarden, Y. et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2(2):127-37 (2001)]; [Takai, N. et al., Cancer 104(12):2701-8 (2005)]; [Patel, D. et al., Int J Oncol 34(1):25-32 (2009)]을 참조한다. 조합 분자가 단일 항체 용법보다 추가되는 또는 심지어 상승작용적 이익을 제공할 수 있다고 제안되었다. 예를 들어, 문헌 [Ranson, et al., Oncology 63 Suppl 1:17-24 (2002)]; [Jackson, J. et al., Cancer Res 64(7):2601-9 (2004)]; [Lee-Hoeflich, S. T. et al., Cancer Res 68(14):5878-87 (2008)]을 참조한다. 이는 특히 여기에서 2가지 수용체가 활발하게 협력하여 종양 세포를 성장시키는 경우이다.

[0440] 본 발명자들은 Her2를 표적화하는 2가지 상이한 항체 및 Her1 (EGFR)을 표적화하는 2가지 상이한 항체로부터 이 중특이적 비스-Fab을 생성하였다. 2가지 Her2-표적화 항체는 페르투주맙 (2C4) 및 트라스투주맙 (Herc)이었다. 이를 항체는 둘 다 이들이 이들의 표적에 어떻게 결합하는지에 대한 지식을 포함하여 잘 특성화된 분자이다. 문헌 [Nature 421(6924):756-60 (2003)]; [Cancer Cell 11 (4):317-28 (2004)]. 2가지 Her1-표적화 항체는 D1-5 및 C3-101이었다. 이를 항체는 둘 다 EGFR의 세포외 도메인 (ECD)에 결합하고, 이들이 EGFR의 ECD 상에 결합하는 영역은 공지되어 있다 (국제 특허 출원 공보 번호 WO 2010/108127).

[0441] 각각의 이들 4가지 항체에 대해, 재조합 티오-Fab을 기재된 바와 같이 이. 콜라이에서 생성하였다. 이어서, 본 발명자들은 이들 4가지 티오-Fab으로부터 합성 매트릭스를 사용하는 조합 포맷으로 비스-Fab을 합성하였다. 본 발명자들은 대략 5 mg의 각각의 티오-Fab로 시작하였다. 본 발명자들은 상이한 티오-Fab을 조합하여 아래 표 1에 진한 글씨체로 나타낸 바와 같은 10가지 특징적인 분자를 합성하였다.

표 1

비스-Fab 합성 매트릭스.

단계 1 (비스-Mal-티오-Fab을 형성하기 위한, + 비스-말레이미도 가교체)				
단계 2 (단계 1로부터 의 비스-Mal- 티오-Fab과 반응시킴)	2C4 ^{VI10C}	Herc ^{VI10C}	D1-5 ^{VI10C}	C3-101 ^{VI10C}
2C4 ^{VI10C}	2C4 ^{VI10C} /2C4 ^{VI10C} (1204)	Herc ^{VI10C} /2C4 ^{VI10C}	D1-5 ^{VI10C} /2C4 ^{VI10C}	C3-101 ^{VI10C} /2C4 ^{VI10C}
Herc ^{VI10C}	2C4 ^{VI10C} /Herc ^{VI10C} (1191)	Herc ^{VI10C} /Herc ^{VI10C} (1188)	D1-5 ^{VI10C} /Herc ^{VI10C}	C3-101 ^{VI10C} /Herc ^{VI10C}
D1-5 ^{VI10C}	2C4 ^{VI10C} /D1-5 ^{VI10C} (1192)	Herc ^{VI10C} /D1-5 ^{VI10C} (1189)	D1-5 ^{VI10C} /D1-5 ^{VI10C} (1400)	C3-101 ^{VI10C} /D1-5 ^{VI10C}
C3-101 ^{VI10C}	2C4 ^{VI10C} /C3-101 ^{VI10C} (1187)	Herc ^{VI10C} /C3-101 ^{VI10C} (1190)	D1-5 ^{VI10C} /C3-101 ^{VI10C} (1193)	C3-101 ^{VI10C} /C3-101 ^{VI10C} (1401)

[0442]

[0443] 대략 1 mg의 표 1에 열거된 각각의 비스-Fab을 합성으로부터 회수하였다. 각각의 비스-Fab은 표 1에 나타낸 바와 같은 특징적인 식별자 (괄호 안의 번호)가 주어졌다. 각각의 비스-Fab의 순도를 SDS-PAGE (도 2a에 나타냄) 및 질량 분광분석법 (데이터는 나타내지 않음)에 의해 분석하였다. 이들 분자는 이들이 모 항체와 유사한 세포 신호전달 및 세포 증식을 억제하는 능력을 유지하는지 여부를 결정하기 위해 시험하였다. 본 발명자들은 세포 신호전달 활성, 형질전환 성장 인자 (TGF α)에 반응한 EGFR의 인산화 및 헤레글린 (HRG)으로의 처리 후에 Her3의 인산화에 대한 2가지 특정 판독물을 시험하였다. Her3 인산화 검정은 특히 Her2가 헤레글린에 반응하여

Her3과 이량체화되는 능력을 프로빙하였다 (문헌 [Junttila, T. T., et al., Cancer Cell 15(5): 429-40 (2009)]). 이량체화는 Her2가 Her3을 인산화시키고, 신호전달 경로를 활성화시키도록 하였고, 이는 헤르셉틴®

및 헤르셉틴®

Fab에 의해 억제된다. 상기 문헌.

[0444] 비스-Fab의 항-EGFR (항-Her1) 활성을 검정하기 위해, NR6-EGFR 세포를 5 nM TGF α 로 처리하여 EGFR의 티로신 인산화를 자극한 후에 50 nM의 단일 용량의 지시된 비스-Fab (도 2b, 상부 패널)로 처리하였다. 각각의 시험된 비스-Fab, 1187, 1189, 1190 및 1192는 항-EGFR (항-Her1) 항체 D1-5 또는 C3-101로부터 유래된 하나의 Fab을 함유하였다. 문헌 [Junttila, T. T., et al., Cancer Cell 15(5): 429-40 (2009)]에 기재된 바와 같이 α -pTyr로 웨스턴 블로트를 프로빙하여 인산화 활성을 분석하였다. 도 2b 상부 패널에 나타낸 바와 같이, 각각의 시험된 비스-Fab은 NR6-EGFR 세포에서 EGFR의 인산화의 강력한 억제를 나타내었다. 에르비톡스®

(세툭시맙)는 EGFR의 ECD에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 (브리스톨-마이어스 스클럽 컴퍼니에서 시판됨)이고, 양성 대조군으로 사용하였다. 블로트를 α -튜불린으로 프로빙하여 각각의 레인에서 단백질 로딩을 정규화하였다.

[0445] Her2-Her3 이량체화의 억제를 검정하기 위해, MCF7 세포에서 Her3의 헤레글린 (HRG)-유도된 티로신 인산화를 문헌 [Junttila, T. T., et al., Cancer Cell 15(5): 429-40 (2009)]에 기재된 바와 같이 항-티로신 웨스턴 블로팅에 의해 모니터링하였다. MCF7 세포를 5nM HRG로 처리하여 Her3의 인산화를 자극한 후에 50 nM의 단일 용량의 지시된 비스-Fab (도 2b, 하부 패널)로 처리하였다. 각각의 시험된 비스-Fab, 1187, 1191, 1192 및 1204는 항-Her2 항체, 2C4로부터 유래된 적어도 하나의 Fab을 함유하였다. 도 2b 하부 패널에 나타낸 바와 같이, 시험된 각각의 비스-Fab은 Her3 인산화의 강력한 억제를 나타내었으며, 이는 Her2-Her3 이량체화를 방해한 결과였다. 모 항체 2C4 (페르투주맙)를 양성 대조군으로 사용하였다. 블로트를 α -튜불린으로 프로빙하여 각각의 레인에서 단백질 로딩을 정규화하였다. 분자의 비스-Fab 적정은 분자가 모 항체 Fab과 유사한 효과적인 억제 농도를 유지한다는 것을 보여주었다 (데이터는 나타내지 않음).

[0446] 다음에 본 발명자들은 배양물에서 세포 성장에 대한 다양한 비스-Fab의 효과를 조사하였다. 유방 종양 세포주, MDA-175 (ATCC HTB-25) 또는 BT474 (ATCC 번호 HTB-20)를 사용하여 항-Her2 유래의 Fab(들)을 함유하는 비스-Fab을 시험하였다. 실험에서 (본원에 나타내지 않음), 본 발명자들은 MDA-175 세포가 Her2 수용체를 발현한다는 것을 결정하였다. 마우스 섬유모세포 세포주를 인간 EGFR로 안정하게 형질감염시키고, NR6-EGFR 세포 (문헌 [Glading et al., J. Biol. Chem. 275:2390-98 [2000]]; [Cancer Res. 67(3):1228-38 [2007]] 참조)를 사용하여 항-Her1 유래의 Fab(들)을 함유하는 비스-Fab을 시험하였다. 각각의 이들 세포주를 표준 세포 배양 절차를 이용하여 유지하고, 증식시켰다. 세포 증식 검정을 위해, 세포를 전면 성장시키고, 배지를 새로운 배지 (DMEM:F12, 10% FCS, 펜스트렙(PenStrep), 글루타맥스(Glutamax))로 교체하였다. 세포를 수확을 위해 트립신화하고, 원심분리에 의해 세척하고, 1% 혈청을 함유하는 새로운 배지로 교체하였다. 세포를 20,000개 세포/mL의 밀도로 조정하고, 250 μ l를 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다 (5,000개 세포/웰). 플레이팅된 세포를 밤새 성장시킨 후에, 다음날 항체 시약 (예를 들어, 비스-Fab)을 웰에 직접 첨가하여 시험접종하였다. 이들 조건하에 5일 동안 세포를 성장시킨 후에, 배지를 웰로부터 흡출하고, 250 μ l의 새로운 배지로 교체하였다. 알라마르 블루 (25 μ l)를 각각의 웰에 첨가하고, 37°C에서 3-4시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 형광 플레이트 판독기에서 545/590 nm (여기/방출)에서 판독하였다. 세포 증식의 양은 상대적 형광 단위 (RFU)로 직접 보고하거나 또는 대조군에 대해 정규화하여 보고하였다.

[0447] 도 2c 및 2d는 지시된 세포 상의 다양한 비스-Fab을 세포 성장에 대한 이들의 효과에 대해 시험한 결과를 보여준다. 도 2c는 각각 2가지 항-Her2 Fab을 함유하는 비스-Fab 1191 및 1204가 MDA-175 세포 성장의 가장 강력한 억제제임을 보여준다. 단일-Fab 분자, 2C4-Fab 및 Herc-Fab은 최소로 강력한 억제제였으며, 하나의 항-Her2 Fab 및 하나의 항-Her1 Fab을 함유하는 비스-Fab 1192는 이 실험에서 MDA-175 세포 성장을 억제하는 그의 능력이 중간 정도였다. 도 2d는 2가지 항-Her1 Fab을 함유하는 비스-Fab 1193가 D1-5 (항-Her1) 모노클로날 항체와 유사하게, NRG-EGFR 세포 성장의 강력한 억제제임을 보여준다. 하나의 항-Her1 Fab을 함유하는 비스-Fab 뿐만 아니라 C3-101-Fab은 여전히 성장 억제 활성을 나타내었으나 덜 강력한 억제제였다. 따라서, 이들 결과는 2C4- 및 Herc-함유 비스-Fab (1192, 1204 및 1191)가 Her2를 발현하는 MDA-175 세포 증식을 억제할 수 있다는 것을 보여준다. 그리고, 항-EGFR Fab(들)을 함유하는 비스-Fab (1187, 1190, 1192 및 1193)는 EGFR

발현 세포주 (NR6-EGFR)에서 세포 증식을 억제할 수 있었다.

[0448] 다음에, 본 발명자들은 그의 모 항체의 구조적 유사체인 2가지 비스-Fab의 시험관내 세포-성장 억제 활성을 그의 모 항체의 시험관내 세포-성장 억제 활성과 직접 비교하였다. 첫번째로, MDA-175 세포 상에서 페르투주맙 (2C4)과 비스-Fab 1204 ($2C4^{V110C}/2C4^{V110C}$) 사이를 비교하였다. 도 2e는 LC-110C-연결된 2C4 비스-Fab이 이 실험에서 MDA-175 세포 증식을 억제하는데 있어 2상 활성을 나타내는 것으로 보인다는 것을 보여주었다. 보다 낮은 농도 (1 nM)에서, 비스-Fab은 성장을 자극하는 것으로 나타났으며, 보다 높은 농도에서는 억제성이었다. 절반-최대 억제는 모 항체, 페르투주맙에 비해 약 2 nM에서 있었다.

[0449] 두번째로 Her2를 과다발현하는 BT474 세포 상에서 트라스투주맙과 비스-Fab 1188 ($Herc^{V110C}/Herc^{V110C}$) 사이를 비교하였다. 본 발명자들은 또한 이 실험에 트라스투주맙-Fab을 포함시켰다. 결과를 도 2f에 나타내었다. 본 발명자들이 상기 논의된 페르투주맙 및 비스-Fab 1204로 관찰한 결과에 기초하여, 본 발명자들은 이 실험에서 비스-Fab 1188이 모 항체, 트라스투주맙과 유사하게 BT474 세포 증식을 억제할 것을 관찰할 것으로 예상하였다. 도 2f는 예상한 바와 같이, 트라스투주맙이 BT474 세포 증식을 강력하게 억제하였으며, 트라스투주맙-Fab이 세포 성장의 덜 강력한 억제제임을 보여주었다. 그러나, 놀랍게도 본 발명자들은 비스-Fab 1188이 세포 증식에 대해 정확하게 반대의 효과를 갖는다는 것을 관찰였다. 도 2f에 명백하게 나타낸 바와 같이, 비스-Fab 1188은 BT474 세포 성장을 강력하게 촉진하였다. BT474 세포는 심지어 임의의 외인성 효능제의 부재하에 빠르게 증식하고, 실제로 이 세포주의 공지된 효능제는 존재하지 않는다. BT474 세포주의 이러한 증식 특성으로 미루어, 비스-Fab 1188이 이를 세포의 효능제로 기능할 수 있다는 발견은 특히 놀랍고 예상하지 못한 것이었다.

[0450] 트라스투주맙의 Fab 아암과 및 비스-Fab 1188의 Fab 사이의 한 가지 구조적 차이는 접합 부위이다. 이들의 중쇄를 통해 연결된 Fab을 갖는 전형적인 IgG 구조를 갖는 모 항체와 대조적으로, 비스-Fab 1188의 2개의 티오-Fab을 가변 도메인과 제1 불변 도메인 사이의 위치에서 이들의 경쇄를 통해 접합시켰다. 수용체를 직접 활성화시키는 Her2에 대한 리간드가 확인되지 않았기 때문에 (문헌 [Yarden, Y. et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2(2):127-37 (2001)]; [Jackson, J. et al., Cancer Res 64(7):2601-9 (2004)]), 비스-Fab과 모 항체 사이의 이러한 구조적 차이가 그의 모체의 길항체 활성 보다는 효능제 활성을 갖는 비스-Fab을 생성할 것임은 예상되지 않았다. 따라서, 이러한 조건하에 효능제 활성을 갖는 트라스투주맙 유사체의 확인은 매우 놀라운 것이었다. 본 발명자들은 구조의 상이한 변화가 분자의 생물학적 활성에 영향을 미칠 수 있는지에 대해 의문을 제기하였다. 따라서, 본 발명자들은 트라스투주맙으로부터 유래된 4가지 상이한 티오-Fab을 생성함으로써 가교된 변이체의 구조 검정, 또는 이들의 유사체 라이브러리를 개발하였다. 이들은 아래에서 보다 상세하게 논의된다.

[0451] 실시예 3 - 트라스투주맙-유래의 비스-Fab 구조적 변이체의 합성 및 특성화

[0452] 상기 기재된 매트릭스 재조합 접근법을 이용하여, 본 발명자들은 일련의 트라스투주맙-유래의 비스-Fab 구조적 변이체를 합성하였다. 본 발명자들은 비스-Fab을 합성하기 위해 4가지 상이한 티오-부착점을 선택하였고, 이 위치 중 2개는 중쇄에 있고, 이 위치 중 2개는 경쇄에 있었다. 티오-부착점을 함유하는 Fab은 3가지 상이한 공급원으로부터 유래하였다; 1) 리신-C로 소화시켜 항체로부터 티오-Fab을 유리시킨, 시스테인 치환을 갖는 티오-Mab, 2) 이. 콜라이에서 직접 발현시켜 정제한, 시스테인 치환을 갖는 티오-Fab, 및 3) 웨신으로의 소화 후에 비-조작된 항체의 헌지 영역에 대한 단일 가교제의 부착을 위해 상기 기재된 효소적 방법에 의해 생성된 헌지-cys-Fab. 이러한 접근법은 티오-Fab에 상이한 티오-Fab과의 재조합을 위한 4가지 상이한 치환 위치를 생성하였고, 이에 따라 구조적 변이체의 패널을 생성하였다 (도 3a). 4가지 상이한 치환 위치는 경쇄의 위치 110 (LC^{110Cys}), 경쇄의 위치 205 (LC^{205Cys}), 중쇄의 위치 118 (HC^{118Cys}), 및 중쇄의 헌지 영역 (HC^{Hg-Cys})에 있다. 합성은 4가지 티오-Fab의 세트를 우선 가교제와 접합시킨 후에 서로 재조합시켜 16개 분자를 생성하는 매트릭스 포맷으로 수행하고, 이를 중 10개는 질량 및 구조가 특징적이었다. 티오-Fab은 합성된 비스-Fab에 대한 특징적인 식별자 및 각각의 비스-Fab에 대한 각각의 티오-Fab의 공급원의 목록과 함께 도 3a에 개략적으로 도시하였다. 합성 반응으로부터의 최종 정제된 생성물을 질량 분광분석법에 의해 특성화하여 시험 물질의 순도를 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 비-환원 SDS-PAGE에 의해 비스-Fab의 분자량을 분석하였다 (도 3b). 도 3b에 나타낸 바와 같이, 모든 비스-Fab 구조적 변이체는 매우 상이한 겉보기 분자량을 가졌으며, 각각의 공급원 티오-Fab이 동일한 분자량의 것이고, 각각의 비스-Fab을 합성하기 위해 동일한 가교제가 사용되었다는 것을 고려하면 이는 흥미로운 결과였다. 상이한 겉보기 분자량에 대해 가장 가능한 설명은 연결 부위 (티오 부착점)가 변성 조건에서 발생하는 선형으로 확장된 폴리펩티드에서 관찰되는 구조적 변이체를 생성한다는 것이다.

[0453]

다음에, 본 발명자들은 각각의 비스-Fab 구조적 변이체를 트라스투주맙과 비교하여 BT474 세포 증식에 대한 이들의 효과에 대해 시험하였다. 도 3c는 다양한 농도 (수평축 상에 표시됨)에서 시험된 각각의 비스-Fab 및 모 항체, 트라스투주맙의 BT474 세포의 성장에 대한 효과를 보여준다. 살아있는 세포를 알라마르 블루 염색에 의해 결정하고, 처리하지 않은 대조군에 대해 정규화된 최대 백분율 (수직축 상의 최대%)로 보고하였다. 도 3c에 나타낸 바와 같이, 트라스투주맙 비스-Fab 구조적 변이체는 모 항체와 유사한 활성을 나타내는 길항체 (비스-Fab 1324, 1328 및 1329)로부터 매우 강력한 효능제 (비스-Fab 1321, 1322, 1323 및 1325)까지 스파닝되는 광범위한 활성을 나타내었다. 흥미롭게도, 이들 효능제 비스-Fab 중 4개는 확인된 본래의 효능제, 비스-Fab 1188 보다 더 강력한 효능제였다 (도 3c). 이러한 검정에서, 가장 강력한 효능제는 $\text{HercHC}^{118\text{Cys}}$ 및 $\text{HercLC}^{205\text{Cys}}$ 의 조합인 비스-Fab 1325였다. 최종적으로, 헤르셉틴®

(트라스투주맙)에 비해 비스-Fab 1325의 BT474 세포 성장에 대한 효과를 시험하는 시간 경과 실험을 수행하였다. 도 3d에 나타낸 바와 같이, 헤르셉틴®

(트라스투주맙) (개방 막대)은 실험의 과정 전반에 걸쳐 세포 성장을 억제하는 한편, 비스-Fab 1325 (위로 경사진 줄무늬 막대)는 세포 성장을 촉진하였고, 이는 상기 기재된 세포 성장 검정과 일치하였다. 아래로 경사진 줄무늬 막대는 처리를 하지 않은 대조군 세포를 나타낸다.

[0454]

본 발명자들은 분자의 특정 물리적 속성과 관련하여 비스-Fab의 다양한 연결 조합을 고려하였다. 도 3b에 나타낸 바와 같이, SDS-PAGE 분석은 상이한 비스-Fab 사이의 겉보기 분자량의 차이를 보여주었다. 그러나, 이는 비스-Fab의 BT474 세포 증식 활성의 신뢰할만한 예측 인자는 아니었다. 가장 두드러지게, BT474 검정에서 가장 강력한 효능제, $\text{HercHC}^{118\text{Cys}}\text{-HercLC}^{205\text{Cys}}$ 는 강력한 효능제의 겉보기 분자량과 매우 근접한 겉보기 분자량을 나타내었다. SDS-PAGE 상에서 관찰된 이동 차이 (연결 부위의 위치 때문일 수 있음) 뿐만 아니라, 본 발명자들은 상이한 물리적 특성을 분석하였다. 본 발명자들은 스캐차드 분석, SEC-MALS 용리 및 분자량 및 유체역학 반경에 의해 내재화에 대해 표적 수용체에 대한 친화도를 시험하였다. 지시된 분자에 대한 세포-표면 해리 상수 (K_d) 및 부위/세포의 분석 결과를 아래 표 2에 나타내었다. 효능제와 길항체 분자 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 도 4는 지시된 분자의 상대적 체류 시간 (수평축 상에 나타냄) (RT) 및 유체역학 반경 (Rh)을 보여주는 쇼덱스(Shodex) SEC 상에서의 젤-여과 분석을 제공한다. 다시, 효능제와 길항체 분자 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 따라서, 이들 실험은 효능제와 길항체 분자 사이에서 이러한 물리적 특성의 임의의 유의한 차이를 보여주지 않았으며, 단지 SDS-PAGE 상에서의 이동 차이 (도 3b) 및 SEC 상에서의 체류의 약간의 이동 (도 4)을 보여주었다.

표 2

길항체 및 효능제 세포-표면 K_d 및 세포 당 부위.

분자	K_d 1 (nM)	K_d 2 (nM)	평균 (nM)	세포 당 부위	세포주
비스-Fab 1188 (효능제)	3.2	3.3	3.3	1.70×10^6	Calu3
헤르셉틴 (트라스투주맙) (길항체)	3.6	3.8	3.7	1.50×10^6	Calu3
헤르셉틴 -Fab (트라스투주맙- Fab) (길항체)	7.3	9.2	8.3	2.10×10^6	Calu3
비스-Fab 1325 (효능제)	3.9	4.0	4.0	0.98×10^6	BT474
헤르셉틴 (트라스투주맙) (길항체)	4.4	4.5	4.5	0.86×10^6	BT474

[0455]

다음에, 본 발명자들은 특히 효능제 처리 후에 BT474 세포에서 수용체 활성화를 조사함으로써 Her 신호전달 경로를 분석하였다. Her2 과다발현 세포주, 예컨대 BT474에서, 헤르셉틴®

(트라스투주맙)은 Her2와 Her3 사이의 리간드-비의존성 상호작용을 억제하였고, 이는 세포 배양물에서 상기 항체의 항증식 효과를 설명한다 (문헌 [Junttila, T. T., et al. Cancer Cell 15(5):429-40 (2009)]). 헤르셉틴®

⑧

(트라스투주맙)에 의한 Her2/Her3 상호작용의 파괴는 Her3의 인산화의 순실 및 세린/트레오닌 키나제, AKT의 활성의 감소를 초래한다. 상기 문헌.

[0457]

본 발명자들은 효능제 비스-Fab 1325, 길항제 비스-Fab 1329, 모 항체, 헤르셉틴®

(트라스투주맙), 및 인산화 작용이 결여된 대조군 항체, gD의 AKT 및 Her3의 인산화에 대한 효과를 비교하였다. BT474 세포를 각각의 이들 분자로 처리하였다. 세포를 처리를 시작하고 10분, 30분 및 2시간 후에 수확하였다. 세포 용해물을 항-포스포 AKT 항체를 사용하는 ELISA에 의해 AKT 인산화에 대해 측정하였다. 결과를 도 5a에 나타내었다. 길항제 헤르셉틴®

(트라스투주맙) 및 비스-Fab 1329는 ELISA에 의해 측정시 인산화된 AKT의 양을 감소시키는 한편, 효능제 비스-Fab 1325는 인산화된 AKT의 양을 증가시켰다 (도 5a). 항체 및 비스-Fab 1329의 억제 활성이 10분에 관찰되었고, 2시간까지 동안 계속 약간씩 증가하였다. 비스-Fab 길항제 1329는 실험의 처음 30분 내에서는 모 항체보다 약간 덜 강력하였으나, 2시간이 되었을 때 동일한 수준의 억제에 도달하였다 (도 5a). 그러나, 효능제 비스-Fab 1325는 10분 후에 포스포-AKT의 수준을 증가시켰고, 포스포-AKT의 수준은 처리 2시간 동안 계속 약간씩 상승하였다 (도 5a). 항체 효과가 gD에서 관찰되었고, 여기서 포스포-AKT 수준은 처리 후에 약간 상승하였다. 그러나, 이 효과는 처리되지 않은 가변성 범위 내에 있었다. 포스포-AKT 항체를 사용한 웨스턴 블로트 분석은 또한 포스포-AKT의 수준이 효능제 비스-Fab 1325에 반응하여 증가하였다는 것을 보여주었다 (도 5b, pAKT 행을 AKT 행과 비교).

[0458]

본 발명자들은 또한 헤르셉틴®

(트라스투주맙) 처리가 인산화된 Her3의 수준을 감소시키는 것으로 알려져 있었기 때문에 (문헌 [Cancer Cell 15(5):429-40 [2009]]) Her3 인산화의 수준을 조사하였다. 이들 실험을 위해, BT474 세포를 96-웰 플레이트에서 2시간까지 동안 헤르셉틴®

(트라스투주맙), 비스-Fab 1325, 비스-Fab 1329 또는 gD로 처리하였다. 지시된 시간 (10분, 30분 또는 2시간)에서, 세포를 가용화시켰다. 세포 용해물의 웨스턴 블로트 분석을 다음과 같이 수행하였다. 세포 용해물을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 니트로셀룰로스 막을 지시된 포스포-특이적 (pHER3, pAKT 또는 pMAPK) 또는 비-포스포-특이적 항체 (HER3, AKT 또는 MAPK)로 프로빙하여 지시된 Her 신호 전달 경로 효소의 활성화 상태를 평가하였다. 항-튜불린 항체를 대조군으로 사용하였다. 도 5b에 나타낸 바와 같이, 항-Her3 포스포티로신 항체를 사용한 웨스턴 블로트 분석은 2시간에 걸쳐 일어난 길항제 헤르셉틴®

(트라스투주맙) 및 비스-Fab 1329에 반응한 포스포-Her3의 특성 및 예상된 감소를 보여주었다 (도 5b, pHER3 행을 HER3 행과 비교). 세포를 gD 항체로 처리하는 것은 Her3 인산화의 수준에 영향을 미치지 않았다 (도 5b, pHER3 행을 HER3 행과 비교). 놀랍게도, 본 발명자들은 효능제 비스-Fab 1325로의 처리에 의해 예측된 포스포-Her3의 증가를 관찰하지 못하였다 (도 5b, pHER3 행을 HER3 행과 비교). 실제로, 2시간 기간에 걸쳐 포스포-Her3의 양이 약간 감소하였고, 이는 길항제를 사용하여 관찰된 것과 유사하였다 (도 5b). 비스-Fab 1325로의 치료에 반응하여 관찰된 MAPK의 인산화 (도 5b, pMAPK 행을 MAPK 행과 비교)는 효능제가 일반적으로 리간드-유도된 활성화와 관련된 경로를 활성화시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 이 놀라운 결과는 Her2 비스-Fab 효능체가 어떠한 메카니즘을 통해 작용하지에 대한 의문을 제기한다.

[0459]

따라서, 본 발명자들은 다음에 세포를 효능제 비스-Fab 1325로 처리하였을 때 Her2의 인산화에 대해 직접적인 영향이 있는지 여부를 조사하였다. 헤르셉틴®

(트라스투주맙) 처리가 Her2의 인산화 상태를 유의하게 변경시키지 않는다는 것이 이전에 밝혀졌다. 문헌 [Kito, K. et al., Curr Genomics 9(4):263-74 (2008)]. Her2가 기초 상태에서 고도로 인산화되기 때문에 (상기 문헌 참조), 본 발명자들은 정량적 질량 분광분석법을 사용하여 상이한 분자에 반응한 Her2 인산화 부위 변화를 프로빙하였다. 포스포-맵핑 기술을 이용하여, 본 발명자들은 처리되지 않은 BT474 세포에서 Her2의 다수의 부위가 상이한 수준으로 인산화된다는 것을 결정하였다 (도 5c, 기초 칼럼). 도 5c의 표는 Her2의 트립신 전달로부터 유래된 인산화된 웹티드의 목록을 제공한다. 각각의 웹티드 서열에서 진한 이탈릭체의 작은 대문자로 표시한 아미노산은 관심있는 인산화된 잔기를 나타낸다. 이들 부위의 정량적 측정은 헤르셉틴®

(트라스투주맙)으로 처리한 후에, 처리하지 않은 세포에 비해 포스포펩티드의 인산화 수준이 거의 변화하지 않았다는 것을 보여주었다 (도 5c 및 5e). 그러나, 효능제 비스-Fab 1325로의 처리는 처리되지 않은 세포에 비해 인산화의 양이 증가한 여러 인산화 부위를 보여주었다 (도 5c 및 5e). 인산화 부위 중 일부는 또한 공지된 PI3K 경로 효능제, 헤레클린으로 처리한 후에 인산화의 수준이 증가하였다 (도 5c 및 5e). 본 발명자들은 또한 통계학적 시험을 수행하였다. 각각의 펩티드를 위해, 혼합 효과 모델을 고정된 효과로서의 처리 및 랜덤 효과로서의 샘플로 상대적 인산화 수준에 대해 평가하였다. 도 5e에 나타내 바와 같이, 투키-크레머(Tukey-Kramer)의 방법을 이용하여 군을 쌍으로 비교함으로써 다중 비교를 위해 조정하였다. 이는 각각의 펩티드에 대해 다중 통계학적 시험의 수행과 관련된 전반적인 가양성 비율을 제어한다. 요약하여, 이들 결과는 증식을 유도하는 세포 신호전달 경로의 가능한 리간드-비의존성 및 Her3-비의존성 활성화를 밝혔다. 또한, 이러한 결과는 세포 증식에 관여하는 추가의 신호전달 성분을 확인할 수 있도록 하였으며, 이에 따라 세포 증식성 장애, 예컨대 암 (이에 제한되지 않음)에 대한 새로운 치료 표적을 확인할 수 있었다.

[0460] 실시예 4 - $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 및 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 를 표적화하는 비스-Fab의 합성 및 특성화

[0461] 비스-Fab 합성 접근법의 상이한 분자 표적에 대한 일반적인 적용가능성을 시험하기 위해, 본 발명자들은 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 를 표적화하는 하나의 항체 (5A6)로부터 유래된 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab 및 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 를 표적화하는 하나의 항체 (22E7)로부터 유래된 티오-Fab 또는 헌지-cys-Fab을 사용하여 이중특이적 비스-Fab 매트릭스를 설계하였다. 5A6 및 22E7 항체는 미국 특허 공보 번호 20060073142 및 문헌 [Jackman, et al., J. Biol. Chem. 285:20850-20859 (2010)]에 기재되어 있다. $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 세포-표면 단백질은 가까운 티로신 키나제 수용체, 예컨대 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 를 탈인산화시켜 이들의 활성을 억제할 수 있는 단백질 티로신 포스파타제이다. 본 발명자들은 비만 세포의 표면 상에서 이들 2가지 수용체를 표적화하는 이중특이적 IgG를 이전에 기재하였다 (상기 문헌). 또한, 본 발명자들은 이중특이적 항체가 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 및 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 에 결합 및 가교되어 이종이량체 수용체 복합체를 형성하고, 이는 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 에 대한 IgE 결합에 의해 개시되는 세포 신호전달 및 히스타민 방출을 강력하게 억제한다는 것을 밝혀냈다. 상기 문헌, 이중특이적 IgG의 작용 메카니즘에 기초하여, 본 발명자들은 비만 세포의 표면 상에서 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 및 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 를 표적화하는 비스-Fab이 유사한 작용 메카니즘을 가질 것이라고 가정하였다. 따라서, 이론에 얹매이지 않고, 본 발명자들은 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 및 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 를 표적화하는 비스-Fab로의 처리가 활성화된 수용체 복합체로 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 를 동원하여 히스타민 방출을 억제한다고 가정하였다.

[0462] $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 및 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 를 표적화하는 비스-Fab을 합성하기 위해, 본 발명자들은 경쇄에서 위치 110 및 중쇄에서 위치 121에 cys 치환을 갖는 각각의 모 항체로부터 티오-Fab을 생성하였다. 본 발명자들은 또한 헌지 영역에 오직 하나의 cys를 갖는 각각의 모 항체로부터 헌지-cys-Fab을 생성하였다. 이들 헌지-cys-Fab을 재조합 DNA 방법을 사용하여, 즉 모 항체 Fab의 DNA 단편을 서브클로닝하고, 이를 이. 콜라이에서 발현시킨 후에 정제하여 제조하였다. 모든 재조합 DNA 방법 및 단백질 정제 방법은 당업자에게 주지되고 일반적으로 상기 기재된 표준 절차이다. 아래 표 3은 티오 부착점을 나타내고, 각각의 비스-Fab에 대한 특징적인 확인 번호 (괄호 안)를 제공하는 비스-Fab 합성 매트릭스를 보여준다.

표 3

비스-Fab 합성 매트릭스.

단계 1 (비스-Mal-티오-Fab을 형성하기 위한, + 비스-말레이미도 가교제)			
단계 2 (단계 1로부터 의 비스-Mal- 티오-Fab과 병용시킴)	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{110\text{C}}$	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{121\text{C}}$	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{\text{Hg-Cys}}$
$\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{110\text{C}}$	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{110\text{C}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{110\text{C}}$ (1307)	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{121\text{C}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{110\text{C}}$ (1301)	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{\text{Hg-Cys}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{110\text{C}}$ (1304)
$\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{121\text{C}}$	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{110\text{C}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{121\text{C}}$ (1305)	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{121\text{C}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{121\text{C}}$ (1299)	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{\text{Hg-Cys}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{121\text{C}}$ (1302)
$\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{\text{Hg-Cys}}$	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{110\text{C}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{\text{Hg-Cys}}$ (1306)	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{121\text{C}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{\text{Hg-Cys}}$ (1300)	$\text{Fc}\gamma\text{RIIb}^{\text{Hg-Cys}}/\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^{\text{Hg-Cys}}$ (1303)

[0463]

[0464] 본 발명자들은 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 및 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 를 둘 다 발현하는 RBL 세포주 변이체의 생성을 이전에 기재하였다 (문헌 [Jackman, et al., J. Biol. Chem. 285:20850-20859 (2010)]). 본 발명자들은 표 3에 열거된 각각의 비스-Fab의 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 및 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 를 둘 다 발현하는 RBL 세포로부터의 히스타민 방출에 대한 효과를 시험하였다. 세포를 증가하는 농도의 각각의 비스-Fab로 처리하고, 히스타민 방출을 ELISA에 의해 측정하였다. 결과를 도 6a-b에 나타내었다. 관찰될 수 있는 바와 같이, 상이한 비스-Fab은 소정 범위의 활성을 나타내었다. 강력한 길항

제 중 몇몇의 경우, 370-110 ng/mL의 농도에서 최고 억제 활성 수준이 관찰되었다. 이는 아마도 최대 개수의 억제성 복합체가 형성되는 농도일 것이다. 보다 높은 농도에서, 비스-Fab의 하나의 아암은 그의 수용체에 결합할 수 있고, 여기서 상이한 아암은 억제성 복합체의 상이한 수용체에 결합할 수 없다. 이는 세포내 신호를 생성하기 위해 수용체 이량체화가 필요한 경우 (예를 들어, VEGF 및 그의 수용체) 몇몇 이량체성 호르몬이 갖는 종 형상의 활성 곡선과 유사할 것이다. 또한, 몇몇 분자는 임의의 억제 활성을 나타내지 않은 한편, 하나의 분자가 현저한 억제를 나타내었다. 이를 결과를 도 6b에 나타내었다. 강력한 억제를 나타내지 않는 4개의 분자 (1299, 1300, 1301, 1302)는 적어도 하나의 중쇄 121Cys 연결을 함유한다. 가장 강력한 억제 분자, 1303은 힌지-cys를 통해 티오-fab 둘 다에 연결된다.

[0465] 실시예 5 - 변형된 비스-Fab 및 생체내 활성

상기 기재된 비스-Fab의 한 가지 특징은 적어도 부분적으로 분자 내에 Fc 영역의 결여로 인해 예상되는 짧은 생체내 반감기이다. 특정 생체내 적용을 위해, 비스-Fab은 천연 항체와 유사한 약동학 특성을 보유하는 것인 바람직할 것이다. 따라서, 본 발명자들은 비스-Fab의 합성에 사용하기 위한 변형된 가교제의 생성 방법을 설계하였다. 아래 상세하게 기재되는 바와 같이, 이러한 변형된 가교제의 사용은 생체내 반감기를 변화시키는데 유용한 시약, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) (이에 제한되지 않음)의 첨가를 허용한다. 또한, 본원에 기재된 바와 같은 변형된 가교제는 영상화제 또는 검출제, 예컨대 형광 태그 (이에 제한되지 않음), 또는 세포독성제, 예컨대 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) (이에 제한되지 않음)로서 유용한 시약, 또는 다른 원하는 특성 또는 기능을 보유하는 시약, 예컨대 siRNA (이에 제한되지 않음)의 첨가를 허용한다.

[0467] 변경된 가교제 및 변형된 비스-Fab의 합성

본 발명자들은 임의의 술프히드릴-반응성 모이어티의 부착을 허용할 변형된 가교제를 합성하기 위한 과정을 설계하였다. 아래, 본 발명자들은 N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트 (SATA)를 비스-말레이미드에 부착시켜, 원하는 관능기의 부착을 위한 추가의 반응에 사용될 수 있는 보호된 SH 기를 갖는 비스-말레이미드-아세틸티오아세테이트 (BMata)를 형성하는 과정을 기재하였다.

본 발명자들은 콴타 바이오디자인 리미티드 (오하이오주 파웰)로부터 수득된 비스-말레이미드 아민 (MW 546.62)으로 시작하였다. 60 마이크로몰 (32 mg)을 100 μ l 디메틸아민 (DMA)에 용해시키고, 1 ml 아세토니트릴로 희석하였다. 130 마이크로몰 (31 mg) SATA (N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트, MW 231.23, 써모 피셔 사이언티픽)를 1 ml 아세토니트릴에 용해시키고, 비스-말레이미드 용액에 첨가하였다. Hepes 완충제 (칼륨 염, pH 7.1, 0.5 M)를 0.15 M의 최종 농도로 첨가하고, 반응 혼합물을 어두운 곳에서 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 혼합물을 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA)으로 4-배 희석한 후에 0.1% TFA 중 15-50%의 아세토니트릴 구배로 10x250 mm C4 칼럼 (비탁(Vydac)) 상에서 분리하였다. 전기분무 질량 분광분석법 (애질런트(Agilent) 6210 TOF)에 의해 평가된 바와 같이 비스-말레이미드-아세틸티오아세테이트 (MW 662.29)를 함유하는 분획을 모으고, 진공 원심분리기에 건조시키고, -20°C에 저장하였다. 이러한 변형된 가교제, BMata를 합성하기 위한 반응을 도 7a에 나타내었다.

BMata에 부착될 수 있는 하나의 시약은 PEG이고, 본 발명자들은 변형된 비스-Fab의 생체내 반감기에 대한 그의 효과에 대해 조사하였다. 본 발명자들은 하기 절차에 따라 PEG와의 후속 반응을 위한 BMata를 함유하는 비스-Fab을 생성하였다.

0471] EGFR (Her1) (C3-101 티오-Fab^{V110C}) 및 Her2 (트라스투주맙 (Herc) 티오-Fab^{V110C})를 표적화하는 1 lot의 비스-Fab을 BMata 가교제를 사용하여 생성하였다. 약 500 mg의 변형된 비스-Fab을 출발 물질로 500 mg의 각각의 티오-Fab을 사용하여 합성하였다. 티오-Fab을 이. 콜라이에서 발현시키고, 상기 기재된 바와 같이 정제하였다. 비스-Fab을 우선 BMata를 트라스투주맙 티오-Fab^{V110C}와 화학적으로 반응시켜 합성하였다. 복합체를 겔 여과에 의해 단리하고, C3-101 티오-Fab^{V110C}와 반응시켜 가교된 이중특이적 폴리펩티드를 생성하였다. 최종 복합체를 다시 겔 여과에 의해 단리하고, 상기 기재된 바와 같이 질량 분광분석법 및 SDS-PAGE에 의해 특성화하였다.

[0472] Bmata에서 차폐된 티올 때문에 (도 7a), 이러한 가교제를 사용하여 생성된 비스-Fab은 차단기를 히드록실아민으로 탈보호시킨 후에 중합체를 함유하는 말레이미도를 사용한 PEG화에 사용할 수 있었다. 이를 수행하기 위해, 비스-Fab을 우선 각각 약 50-60 mg의 몇몇 분취액으로 분리하였다. 각각의 분취액에, pH 7.2의 포스페이트 완충 염수 (PBS) 중 1/10 부피의 0.5 M 히드록실아민, 25 mM EDTA를 첨가하였다. 탈보호는 실온에서 약 2시간 동안 진행시켰다. 히드록실아민에 의한 보호기의 제거는 42 달톤의 손실을 초래하였으며, 질량 분광분석법에 의

해 비스-Fab의 질량 변화에 의해 관찰될 수 있다 (데이터는 나타내지 않음). 탈호보 후에, 1:1 몰 당량의 PEG-말레이미도를 비스-Fab 분취액에 첨가하고, 2-20시간 동안 반응시켰다. 이는 비스-Fab을 단일 PEG를 함유하는 보다 높은 분자량 종으로 거의 완전하게 전환시켰다 (데이터는 나타내지 않음). 일반적인 반응식을 도 7b에 나타내었다.

[0473] BMata 가교된 비스-Fab C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}로 출발하여, 몇몇 상이한 크기의 PEG 중합체를 상기 기재된 합성 반응에 사용하여 다양한 분자량의 PEG를 보유하는 PEG화된 비스-Fab을 생성하였다. 다양한 PEG 중합체를 NOF 코포레이션(NOF Corporation) (일본)으로부터 말레이미도 유도체로 구입하였다. PEG 시약과 반응시킨 후에, PEG화된 비스-Fab을 25 mM MES, pH 5.8, 300 mM NaCl 및 1 mM EDTA에서 S-200 겔 여과에 의해 정제하였다. 도 8a는 정제된 비스-Fab의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 5가지 상이한 반응 생성물을 왼쪽으로부터 오른쪽으로 나타내었다. 왼쪽으로부터 시작하여, N-에틸말레이미드 (NEM) 캡과 반응시킨 BMata 비스-Fab, 이어서 각각 2 kDa, 12 kDa 및 20 kDa의 선형 PEG 쇄와 반응시킨 BMata 비스-Fab, 및 마지막으로, 말레이미도-알부민-결합-펩티드, ABP, mal-H, QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (서열 24)와 반응시킨 BMata 비스-Fab이다. 문헌 [Nguyen et al., Prot. Engineering, Design and Selection 19:291-97 (2006)]. 혈청 알부민에 대한 결합을 증가시킴으로써 비스-Fab의 반감기를 증가시키기 위한 수단으로서의 PEG에 대한 대안으로 ABP 모이어티를 조사하기 위해 비스-Fab-ABP를 합성하였다. 상기 문헌 참조.

[0474] 이들 5가지 변형된 비스-Fab을 겔 여과 크로마토그래피에 의해 분석하였고, 크게 증가한 유체역학 반경을 갖는 것으로 나타났다. 비스-Fab을 함유하는 20K PEG 및 12K PEG 및 비스-Fab을 함유하는 ABP가 전형적인 인간 IgG (체류 시간 25.2분)보다 훨씬 이전에 관찰되어 S-200 겔 여과 상에서 용리하였다 (도 8b). 다음에, 본 발명자들은 마우스 및 누드 래트 둘 다에서 각각의 이들 5가지 변형된 C3-101^{V110C}/Herc^{V110C} 비스-Fab의 약동학 파라미터 (반감기 포함)를 조사하였다. 이들 실험 및 결과를 아래 상세하게 기재하였다.

비스-Fab 약동학

[0475] 상기 기재된 BMata-PEG 또는 BMata-ABP 변형의 C3-101^{V110C}/Herc^{V110C} 비스-Fab의 생체내 혈청 반감기에 대한 효과를 평가하기 위해 2가지 별도의 실험을 수행하였다. 단일 5 mg/kg IV 볼루스 용량을 마우스 또는 누드 래트에게 투여하고, 혈청에 존재하는 비스-Fab을 14일까지 동안 분석하였다. 개별 마우스를 각각의 데이터 지점에서 사용한 반면, 래트에서는 실험 과정에 걸쳐 동일한 동물로부터 혈청 샘플을 채취하였다.

[0476] 마우스 및 래트 혈청에서 무손상 이중특이적 비스-Fab을 검출하기 위해 ELISA 검정을 개발하였다. ELISA의 상세한 내용은 다음과 같다.

[0477] [0478] 설치류 혈청 중의 비스-Fab의 농도를 ELISA를 사용하여 결정하였다. 간략하게, PBS에서 1 μ g/ml로 희석된 EGFR-Fc (제넨테크 시약)를 384 웰 맥시소르브(Maxisorb) 폴리스티렌 플레이트 (날개이트 넌크 인터내셔널 (Nalgate Nunc International) Cat# 464718) 상에 코팅하였다. 16 내지 72시간 후에, 코팅을 제거하고, 플레이트를 0.5 내지 3시간 동안 차단 완충제 (PBS/0.5% BSA/프로클린 300)로 차단하였다. 비스-Fab 표준의 희석액 (0.156 내지 20 ng/ml)을 검정 완충제 (PBS/0.5% BSA/0.05% 트윈 20/0.25% CHAPS/5mM EDTA/0.2% BGG/0.35M NaCl/15 ppm 프로클린 300)에서 제조하였다. 샘플 (비스-Fab을 함유하는 래트 또는 마우스 혈청)을 검정 완충제에서 1/100의 최소 희석으로 희석한 후에, 검정 범위로 8배 연속적으로 희석하였다. 차단된 플레이트를 세척 완충제 (PBS/0.05% 트윈 20)로 3회 세척하고, 표준 및 샘플을 적절한 검정 웰에 첨가하였다. 1시간 인큐베이션 후에, 플레이트를 세척 완충제로 6회 세척하였다. 결합된 비스-Fab을 비오티닐화된 HER2 ECD를 사용하여 검출하였다 (제넨테크 시약 Lot 39575-15-비오티닐화를 NHS-숙신이미드 화학 (비오틴-X-NHS 리서치 오가닉스 10554B-2)을 이용하여 수행함). 1시간 인큐베이션 후에, 플레이트를 세척 완충제로 6회 세척하고, 결합 완충제 (PBS/0.5% BSA/0.05% 트윈 20/15 ppm 프로클린 300)에서 1/40,000 희석된 스트렙타비딘 연결된 양고추냉이 페옥시다제 (지이 헬스케어 RPN1231)를 모든 검정 웰에 첨가하였다. 30분 인큐베이션 후에, 플레이트를 6회 세척하고, 기질 TMB (KPL Cat# 50-65-02)를 모든 검정 웰에 첨가하였다. 기질 반응을 15-20분 후에 1 M 인산으로 중단시켰다. 플레이트를 620 nm의 참조 파장을 사용하여 450 nm에서 판독하였다. 4-파라미터 곡선-핏팅 알고리즘을 사용하여 결과를 표준과 비교함으로써 샘플 농도를 결정하였다.

[0479] 마우스 및 래트 둘 다에서, 비스-Fab에 PEG를 첨가하는 것은 분자의 제거율을 저하시켰다 (도 9a-b, 표 4). 2K PEG화는 2의 인자로 제거율을 감소시키는 것으로 관찰되었다 (도 9a-b, 표 4). 20K PEG를 첨가하여, 비스-Fab 반감기를 30-35시간으로 연장시킬 수 있었다 (도 9a-b, 표 4). 이들 결과는 소정 범위의 투약이 비스-Fab에 대해 달성될 수 있고, 분자의 PK를 조정하여 부착된 PEG의 크기 변화에 의한 상이한 요구를 수용할 수 있다는 것

을 나타낸다. PEG화되지 않은 비스-Fab의 제거율을 대략 $F(ab')_2$ 에 대해 예상되는 것이었고, 20K PEG화된 비스-Fab은 IgG에 더 가까운 반감기 및 제거율을 보유하였다. 또한, 12K-비스-Fab과 20K-비스-Fab 사이에는 반감기 차이가 거의 없었으며 (도 9a-b, 표 4), 이는 보다 큰 PEG가 반감기를 유의하게 증가시킬 수 없다는 것을 나타낸다. 최종적으로, 이들 실험에서 ABP-비스-Fab 반감기는 변형되지 않은 비스-Fab보다 유의하게 연장되지 않았다. (도 9a-b, 표 4). 추가의 약동학 데이터를 아래 표 4에 나타내었다.

표 4

두 구분되는 모델을 기반으로 하는 약동학 파라미터.

	알파_HL	AUC	베타_HL	CL	Cmax	V1	Vss
처리	시간	일 *ng/mL	시간	mL/일 /kg	ng/mL	mL/kg	mL/kg
마우스							
표지되지 않음	1.55	23239	10.8	215	99660	50.2	103.6
2 PEG	5.85	41986	17.2	119	87946	56.9	74.2
12 PEG	7.18	104356	27.7	47.9	161283	31.0	47.3
20 PEG	6.78	91896	31.1	54.4	126336	39.6	66.9
ABP	2.94	47753	11.4	105	128186	39.0	56.3
래트							
표지되지 않음	4.1	30855	16.4	163.3	N/A	52.2	70.2
2 PEG	5.0	49272	18.3	106	N/A	52.5	76.9
12 PEG	6.1	83665	26.4	61.1	N/A	43.3	68.7
20 PEG	4.7	96669	32.2	53.1	N/A	41.7	80.2
ABP	6.8	76078	19.2	70.6	N/A	43.2	51.4

알파_HL = 알파 상 반감기; 베타_HL = 베타 상 반감기; AUC = 마지막 관찰 지점까지의 혈청 농도-시간 곡선 아래 면적; CL = 제거율; Cmax = 투약 기간 동안 최대 관찰된 농도; Vss = 항정 상태에서의 분포의 부피 ; N/A = 이용가능하지 않음.

[0480]

[0481] 비스-Fab 생체내 활성

[0482] 생체내 마우스 이종이식편 모델 연구를 위해, 본 발명자들은 다음과 같이 PEG화된 비스-Fab을 구축하였다. 본 발명자들은 우선 Her2-표적화 티오-Fab, 2C4^{V110C} 및 EGFR (Her1)-표적화 티오-Fab, D1-5^{V110C}를 함유하는 BMata 가교된 비스-Fab을 생성하였다. 이어서, 이 BMata 가교된 비스-Fab을 히드록실아민 및 1:1 몰 당량의 20K mal-PEG와 반응시켜 PEG화된 비스-Fab을 생성하였다. PEG화된 비스-Fab을 정제하고, SDS-PAGE에 의해 분석하였다 (도 10a). PEG화된 비스-Fab을 시험관내에서 Calu3 세포의 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. Calu3 세포는 Her2 및 EGFR을 둘 다 발현하는 것으로 공지되어 있다 (데이터는 나타내지 않음). 검정을 위해, 웰 당 8500개 세포를 시딩하고, 2 nM 헤레글린 및 5nM TGF α 로 처리하였다. 이어서, 본 발명자들은 다양한 농도의 비스-Fab 및 모 항체 (도 10b의 수평축 상에 나타낸 농도)를 리간드-자극된 세포 성장을 차단하는 능력에 대해 시험하였다. 알라마르 블루 (25 μ l)를 각각의 웰에 첨가하고, 37°C에서 3-4시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 545/590 nm에서 형광 플레이트 판독기에서 판독하였다. 세포 증식의 양을 상대적 형광 단위 (RFU)로 직접 보고하거나 또는 대조군에 대해 정규화하여 보고하였다. 도 10b는 이 실험에서 PEG화된 비스-Fab이 Calu3 증식의 강력한 억제제임을 보여준다. 실제로, 이는 모 항체, 2C4 및 D1-5보다 더 강력하였다.

[0483] 다음에, 본 발명자들은 SCID 베이지 마우스에서 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab의 약동학을 평가하였다. C3-101^{V110C}/Herc^{V110C} 비스-Fab에 대해 상기 기재된 바와 유사한 ELISA-기반 포획 검정을 이용하여 혈청 중의 분자의 양을 결정하였다. 도 11a는 혈청 농도 대 시간으로 플로팅된 결과를 보여주는 한편, 도 11b는 혈청 농도/용량 대 시간으로 플로팅된 결과를 보여준다. 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab을 20K-PEG-C3-101^{V110C}/Herc^{V110C} 비스-Fab보다 혈청으로부터 더 빠르게 제거되었다 (도 11a-b를 도 9a와 비교). 본 발명자들은

숙주 교차-반응성이 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab의 보다 빠른 제거를 설명한다고 여긴다. 이 실험에서 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab의 상대적으로 짧은 반감기를 추가로 설명하는 수치 데이터를 아래 표 5에 제시하였다.

표 5

약동학 파라미터.

용량 (mg/kg)	HL-람다_z (시간)	CL _{obs} (mL/day/kg)	용량에 의해 정규화된 AUC _{inf-obs}
0.5*	4.61	200	5.01
5.0	3.84	102	9.81
50	7.27	53.1	18.8

* 2 hr 시점은 데이터 분석에서 제외되었다.
HL-람다_z는 제거 상과 관련된 반감기를 나타내고, CL_{obs}는 관찰된 소거율을 나타내고,
AUC_{inf-obs}는 무한대까지 추정되는 혈청 농도-시간 곡선 아래의
관찰된 면적을 나타낸다.

[0484]

[0485] 다음에, 본 발명자들은 SCID 베이지 마우스의 Calu3 이종이식편 모델에서 모 항체 2C4 및 D1-5와 비교한 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab의 효과를 조사하였다. 본 발명자들은 5,000,000개 Calu3 세포/마우스를 주사한 후에 매일 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab (50 mg/kg), 2C4 (25 mg/kg) 또는 D1-5 (25 mg/kg)를 주사하였다. 실험 과정 동안 종양 부피를 주기적으로 측정하였다 (도 12에 나타낸 시점). 도 12에 제시된 결과는 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab이 각각의 모 항체에서 관찰된 효과와 유사하게, 이 농도에서 종양의 성장을 자연시키는데 효과적이었다는 것을 나타낸다.

[0486]

이어서, 본 발명자들은 상기 기재된 Calu3 이종이식편 마우스 모델에서 모 항체, 2C4 (페르투주맙) 및 D1-5와 비교하여 종양 세포 성장에 대한 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab의 효과를 평가하기 위한 확대된 연구를 수행하였다. 우선, 본 발명자들은 종양 진행에 소요되는 기간 (종양이 2배 크기 (2xV₀)가 되는데 소요되는 시간으로 정의됨) 또는 어떠한 종양 부피 진행도 없다면 생존 기간을 분석하였다.

[0487]

이들 실험을 수행하기 위해, 5,000,000개 Calu3 세포 (HBSS에 혼탁시킴)를 SCID 베이지 마우스 (찰스 리버 랩스 (Charles River Labs) (샌 디에고 시설)로부터 얻은 마우스)에 피하 접종하였다. 모 항체, 2C4 및 D1-5를 25 mg/kg (물질의 농도는 5 mg/ml이었음)에서 4주 동안 일주일에 1회 IP 투여하였다. 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab을 50 mg/kg (물질의 농도는 7.5 mg/ml이었음)에서 28일 동안 매일 1회 IP 투여하였다. 모든 경우에, 제1 용량은 2X 로딩 용량 (즉, 50 mg/kg 2C4 및 D1-5 [물질의 농도는 10 mg/ml이었음] 및 100 mg/kg 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab [물질의 농도는 7.5 mg/ml이었음])이었다.

[0488]

카플란-마이어 분석을 도 13a에 나타내고, 일방향 분석을 도 13b에 나타내었다. 두번째로, 본 발명자들은 종양 진행에 소요되는 기간 (종양이 1500 mm³의 부피에 도달하는데 소요되는 시간으로 정의됨) 또는 어떠한 종양 부피 진행도 없다면 생존 기간을 분석하였다. 카플란-마이어 분석을 도 14a에 나타내고, 일방향 분석을 도 14b에 나타내었다. 이들 연구의 결과는 20K PEG- 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C} 비스-Fab이 치료 용량에서 종양 세포 성장을 억제하는데 효과적이었으며, 각각의 모 항체의 효과에 도달하였다는 것을 나타낸다. 따라서, 여기 기재된 이종특이적 항체 포맷은 치료 분자의 개발에 유용한 플랫폼이다.

[0489]

논의

[0490]

Her2는 심장, 유방 및 신경 조직에서 정상적인 발생 및 세포 성장에 관여하고, 상이한 기관 계의 발생과 관련된다. 문헌 [Falls, D. L. et al., Exp Cell Res 284(1):14-30 (2003)]; [Casalini, P., et al., J Cell Physiol 200(3):343-50 (2004)]; [Negro, A., et al., Recent Prog Horm Res 59:1-12 (2004)]; [Britsch, S. Adv Anat Embryol Cell Biol 190:1-65 (2007)]. 가장 주목할 만한 것은 유방암 세포 증식에서의 Her2 과다발현의 관여 및 헤르셉틴®

(트라스투주맙)으로부터 이익을 얻을 유방암 환자를 확인하기 위한 진단 마커로서의 Her2의 용도이다. 문헌 [Lee, K. F., et al., Nature 378(6555):394-8 (1995)]; [Erickson, S. L., et al., Development

124(24):4999-5011 (1997)]; [Britsch, S., et al., Genes Dev 12(12):1825-36 (1998)]; [Morris, J. K., et al., Neuron 23(2): 273-83 (1999)]; [Woldeyesus, M. T., et al., Genes Dev 13(19):2538-48 (1999)]; [Lin, W., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 97(3):1299-304 (2000)]; [Park, S. K., et al., J Cell Biol 154(6):1245-58 (2001)]; [Leu, M., et al., Development 130(11):2291-301 (2003)]; [Brufsky, A. Am J Clin Oncol. Aug. 11, 2009 (EPub PMID: 19675448)]. 헤르셉틴®

(트라스투주맙)은 막횡단 영역 근처의 수용체의 세포외 부분의 제4 도메인에 결합하는 모노클로날 항체이다 (문헌 [Cho, H. S., et al., Nature 421(6924):756-60 [2003]]). Her2는 세포 성장 및 발생에 기여하는 제4 수용체의 패밀리 중 하나이고, 또한 질환 치료를 위한 표적이다 (문헌 [Casalini, P., et al., J Cell Physiol 200(3):343-50 [2004]]). 하나 초과의 수용체의 통합된 노력은 종종 종양 세포 성장을 이끄는 역할을 한다 (문헌 [Yarden, Y. et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2(2):127-37 (2001)]; [Lee-Hoeplich, S. T., et al., Cancer Res 68(14): 878-87 [2008]]). 이와 관련하여, 하나 초과의 수용체의 활성의 중화는 특정 암에 대해 특히 효과적인 치료를 제공하기에 바람직할 수 있을 것이다. 이러한 분자를 구축 및 설계하기 위한 한 가지 접근법은 이 중특이적 항체 기술을 사용하는 것이며, 이에 의해 단일 항체 분자는 2가지 특징적인 모노클로날 활성을 보유한다 (문헌 [Drakeman, D. L., et al., Expert Opin Investig Drugs 6(9):1169-78 (1997)]; [Kontermann, R. E. Acta Pharmacol Sin 26(1):1-9 (2005)]; [Chames, P. et al., Curr Opin Drug Discov Devel 12(2):276-83 [2009]]).

[0491]

본 발명자들은 적어도 부분적으로 이러한 분자를 스크리닝하고, 단일 항체 또는 항체 조합에서 증가된 효능을 제공할 수 있는 것을 찾기 위한 수단으로서 본원에 기재된 비스-Fab 기술을 개발하였다. 본 발명자들은 비스-Fab 합성 과정이 이중특이적 분자를 생성하기 위한 강건하고 간단한 방법이라는 것을 입증하였다. 본 발명자들은, 일반적으로, 비스-Fab 분자가 두 모 항체의 조합된 생화학적 활성을 보유한다고 결정하였다. 본 발명자들은 일부 비스-Fab에서 세포-표면 친화도가 약간 떨어지는 것을 관찰하였으며, 이는 분자의 1가 구조 때문일 수 있다. 그러나, 이는 다수의 방식으로 과생된 것일 수 있다. 예를 들어, 하나의 세포의 표면 상에서 2개의 수용체를 표적화하는 비스-Fab을 합성할 수 있거나, 동일한 수용체 내의 2개의 도메인을 표적화할 수 있거나, 또는 1가 Fab 친화도를 증가시킬 수 있다. 여기 기재된 매트릭스 접근법을 이용하여 Her2 및 EGFR를 표적화하는 비스-Fab의 세트의 합성은 다양한 검정을 위해 충분한 양으로 고도로 순수한 분자를 생성하였다.

[0492]

세포-기반 검정에서 비스-Fab을 사용하여, 본 발명자들은 일부 특징적인 활성을 관찰하였다. 예를 들어, 비스-Fab 1191은 특징적이지 않게 가파른 억제 곡선에서 강력한 세포 증식 억제를 나타내었다 (도 2c). 이 분자의 흥미로운 측면은 이것이 Her2의 2가지 상이한 도메인에 동시에 결합한다는 것이다. 비스-Fab의 2C4 아암은 ECD의 도메인 II를 표적화하고, 비스-Fab의 Herc 아암은 도메인 IV를 표적화한다 (문헌 [Franklin, M. C., et al., Cancer Cell 5(4):317-28 (2004)]; [Schmitz, K. R., et al., Exp Cell Res 315(4):659-70 [2009]]). 곡선은 협력적으로 나타나고, 이는 동일한 표적에서 2개의 도메인에 결합하는 분자에 특징적인 작용 메카니즘을 제안할 수 있다. 이러한 분자는 특정 치료 설정에서 단일 항체 또는 2개의 개별 모노클로날 항체의 조합에 대해 효능작용적 이익을 제공할 것이다.

[0493]

그러나 더 놀라운 또 다른 발견은 트라스투주맙 티오-Fab을 서로 연결시켜 비스-Fab 1188을 형성한 것이다. 이러한 경우에, 비스-Fab은 단일 모 항체와 구조적으로 유사한데, 예외로 Fc 부분이 결여되어 있고, Fab이 천연 힌지 디슬퍼드 연결과 상이한 부위에서 공유 결합에 의해 연결된다는 점이 다르다. 비스-Fab 1188, Herc LC^{110Cys}-Herc LC^{110Cys}는 강력한 길항체 대신 효능제로 작용하여 세포 증식에서 예상하지 못한 부스팅을 나타내었다 (도 2f). 이는 그의 구조적으로 유사한 모 항체의 활성과 반대되는 활성이었을 뿐만 아니라 Her2를 과다발현하는 BT474 세포에서의 세포 증식이 리간드-의존성이 아니고, 기초 상태에서 최대로 자극된 것으로 여겨졌기 때문에 놀라운 것이었다. 또한, 2개의 2C4 Fab을 함께 연결하는 상이한 비스-Fab은 그의 모 항체와 유사한 활성을 가졌다 (도 2e). 이론에 얹매이지 않고, 상이한 항체로부터 유래된 Fab의 상이한 작용 메카니즘은 비스-Fab에서 관찰된 상이한 결과를 설명할 수 있을 것이다. 2C4는 도메인 II에 결합하여, 그 자체 및 다른 Her 패밀리 구성원과의 Her2의 이량체화를 억제하는 반면, 트라스투주맙은 도메인 IV가 이량체화 도메인이 아니므로 복합체 형성에 상이하게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 트라스투주맙 에피토프는 막횡단 영역과 매우 근접하며, 이 위치는 항체가 2가지 키나제 도메인의 배향에 영향을 미치는 막횡단 영역의 배향에 유의한 영향을 미칠 수 있는 곳이다 (문헌 [Cho, H. S., et al., Nature 421(6924):756-60 [2003]]). 키나제 활성 부위와의 알로스테릭 또는 다른 직접적인 상호작용은 항체 또는 비스-Fab이 가까이 근접한 2개의 수용체 분자에 결합하는 것에 의해 영향을 받을 수 있다 (문헌 [Bocharov, E. V., et al., J Biol Chem 283(11):6950-6 (2008)];

[Schmitz, K. R., et al., *Exp Cell Res* 315(4):659-70 [2009]]).

[0494] 1188 비스-Fab은 헤르셉틴®

(트라스투주맙)의 구조적 유사체이므로, 본 발명자들은 연결 부착 부위의 변화가 이들 분자의 기능을 추가로 변경시킬 것인지 여부를 조사하였다. 본 발명자들은 또한 상이한 공급원으로부터 제조된 티오-Fab의 효과를 조사하였다. 본 발명자들은 펩신에 의한 소화 후에 천연 항체 헌지 영역을 사용하여 양호한 결과를 수득할 수 있다는 것을 보여주었다. 이는 분자의 돌연변이체 (cys-조작된) 형태를 생성해야 하지 않고 비스-Fab을 구축하기 위한 출발 지점으로서 임의의 항체 공급원을 사용하도록 한다. 물론, 티오-부착점이 헌지 영역으로 제한되기 때문에, 단지 특정 구조적 변이체만이 생성될 수 있다. 본 발명자들은 또한 리신-C로의 단백질분해적 소화에 의해 제조된 티오-Mab으로부터 유래된 티오-Fab을 사용하여 양호한 결과를 수득할 수 있다는 것을 보여주었다. 또한, 재조합 티오-Fab을 구축하고, 이. 콜라이에 발현시키고, 정제하고, 또한 양호한 결과를 나타내는 비스-Fab을 생성하는데 성공적으로 사용하였다. 따라서, 이러한 방법은 모두 신규 비스-Fab 합성 및 발견을 위한 일반적인 기회를 제공한다.

[0495] Herc 비스-Fab의 연결을 변화시킨 본 발명자들의 조사로 강력한 효능제, 길항제, 및 세포 성장에 대해 거의 효과를 나타내지 않는 분자로부터의 활성의 완전한 스펙트럼을 확인하였다. 따라서, 모 항체와 상이한 활성을 보유하는 분자를 확인하는 것이 가능해질 것이다. 이전에, 항체의 헌지 영역의 변화는 항체 기능에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Dillon, T. M., et al., *J Biol Chem* 283(23):16206-15 [2008]]). 활성이든 억제성이든 원하는 활성을 보유하는 항체를 확인하거나, 또는 변화하는 수준의 활성을 갖는 항체를 확인하는 것이 항상 가능한 것은 아니었다. 따라서, 비스-Fab 연결 변이체는 원하는 활성을 추가로 조작하는 접근법을 제공한다. 또한, 항-CD20 항체를 사용한 이전의 연구는 항체가 에피토프와 상호작용하는 방식의 미묘한 변화가 기능에 영향을 미칠 수 있다는 것을 밝혀냈다 (문헌 [Ernst, J. A., et al., *Biochemistry* 44(46):15150-8 [2005]]). 따라서, 전형적인 항체 조작 프로그램은 보다 강력하고 효과적인 치료 후보 분자의 구축을 돋우기 위한 Fab의 공유 결합을 포함하도록 확장될 수 있다.

[0496] 본 발명자들은 또한 강력한 비스-Fab 길항제, 1329 및 헤르셉틴®

(트라스투주맙)과 비교하여 비스-Fab 효능제 1325 및 1188의 특정 물리적 및 생화학적 특성을 조사하였다. 본 발명자들은 효능제와 길항제 사이에 BT474 세포의 표면 상의 수용체 결합 부위의 수에 차이가 없다는 것은 발견하였다. 또한, 스캐차드 분석에 의해 결정된 바와 같이 세포 표면에 대한 분자의 친화도에 차이가 없었다. kD는 두 유형의 분자의 경우 약 3 nM이었다. 본 발명자들은 또한 분자량, 겔 여과에 의한 체류, 및 각각의 분자의 유체역학 반경을 평가하였으나, 다시 본 발명자들은 이들 물리적 특성에 큰 차이가 없다는 것을 관찰하였다. 효능제 분자가 SEC-MALS 분석에 의해 보다 큰 유체역학 반경을 갖는 경향이 약간 있었으나; 관찰된 차이는 오차 범위 내에 있었다. 구조에서 한 가지 주요 분석적 차이가 SDS-PAGE 상에서 관찰되었는데, 분자량이 거의 동일한 이들 분자가 겔 상에서 큰 이동 차이를 나타내었다. SDS-PAGE의 변성 조건은 본 발명자들의 용액 상태 분석과 상관관계가 없었다. 예를 들어, 가장 강력한 효능제, 1325가 양극단 사이에서 이동하고, 강력한 길항제, 1324와 유사하였기 때문에 겔 상에서 관찰된 차이는 활성과 관련된 패턴을 나타내지 않았다. 이들 분자에서 한 가지 주요한 차이는 서로에 대한 Fv 영역의 배향이다. 이는 분자 사이의 활성 차이를 설명할 수 있었다. 본 분석은 예상되는 구조-기능 패턴을 밝히지 못하였으나, 보다 자세해진 구조-기능 조사는 활성 관계를 이해하기 위한 3D-모델링 접근법을 설계할 수 있도록 하였다. 현재, 임의의 항체 또는 항체 조합의 기능적 변이체가 여기 기재된 합성 매트릭스 과정에 기초한 실험적 접근법 및 관심있는 항체(들)에 대해 이용가능한 기능적 활성 검정을 이용하여 용이하게 확인될 수 있다.

[0497] 트라스투주맙 티오-Fab 조합 매트릭스, 1325로부터 유래된 가장 강력한 효능제를 사용하여, 본 발명자들은 세포 증식 신호의 전파에 관여하는 신호전달 경로를 조사하였다. 신호전달 경로를 시험하기 위해, 본 발명자들은 최근에 보고된 트라스투주맙의 활성의 잘 특성화된 분석을 시작하였다. 여기서, 트라스투주맙은 Her2를 과다발현하는 세포 상에서 Her2 및 Her3의 상호작용을 억제하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Junttila, T. T., et al., *Cancer Cell* 15(5):429-40 [2009]]). 이들 2가지 수용체는 기초 상태에서 PI3K을 동원하고 활성화시키는 복합체로 존재한다. 이러한 키나제의 활성화는 주요 신호전달 키나제 AKT의 인산화 및 활성화를 유발한다. 상기 기재된 본 발명자들의 실험에서, AKT는 효능제 비스-Fab 1325로 처리한 세포에서 활성 더 높은 수준으로 인산화되었다. 이는 본 발명자들이 예상한 것이고, Her2에 대해 공지된 세포-증식 신호전달 경로와 일치한다. 상이하고 예상하지 못한 것은 Her3의 인산화 수준이 효능제 첨가로 변화하지 않았다는 것이다. 실제로, 2시간의 시간 과정에 걸쳐 Her3의 포스포-티로신 수준이 약간이지만 감소한 것으로 나타났다. 이는 Her2/Her3 상호작용을

우회하여 AKT의 활성을 자극할 수 있다는 것을 제안한다. 이는 Her2의 인산화 상태를 직접 변경하여 달성될 수 있다. 본 발명자들은 질량 스펙트럼 분석에 의해 Her2의 인산화 상태를 프로빙하여 수용체 세포내 도메인 (ICD)에서 개별 포스포-펩티드를 조사하였다. 우선, 본 발명자들은 BT474 세포에서 기초 상태에서 인산화된 몇몇 펩티드를 확인하였다. 이어서, 본 발명자들은 트라스투주맙 또는 1325 효능제 처리에 반응한 Her2의 인산화 백분율을 조사하였다. 본 발명자들은 전체 중에서 이를 인산화 부위 중 몇몇이 효능제에 반응하여 변화되었지만 트라스투주맙에 반응하여 변화되지 않았다는 것을 관찰하였다. 효능제는 수용체를 추가로 활성화시켰으나, 이러한 활성화가 Her3의 인산화를 증가시키지는 않은 것으로 나타났다. 이는 약간 상이한 활성화 복합체가 신호를 전파할 수 있다는 것을 나타내고, 비스-Fab 1325가 심지어는 Her3 또는 리간드의 부재하에 Her2를 활성화시키는데 유용할 수 있다는 것을 제안한다.

[0498] 따라서, 본 발명자들은 Her2의 활성화가 유용할 수 있는 가능한 치료 영역을 조사하였다. 헤르셉틴®

(트라스투주맙)과 심장 근육의 건강 사이의 연관성이 문서화되어 있다. 문헌 [Chien, K. R. N Engl J Med 354(8):789-90 (2006)]; [Perik, P. J., et al., Eur J Heart Fail 9(2):173-7 (2007)]; [Suter, T. M., et al., J Clin Oncol 25(25):3859-65 (2007)]. 헤르셉틴®

(트라스투주맙) 치료 동안 심장 독성이 발생할 수 있다. 특정 화학요법 약물, 예를 들어 안트라시클린의 존재 하에, 헤르셉틴®

(트라스투주맙) 치료 동안 심독성의 발생이 유의하게 상승하는 것으로 나타났다 (문헌 [Morris, P. G., et al., Breast Cancer Res Treat DOI 10.1007/s10549-008-0172-5 (2008)]; [Popat, S., et al., Nat Clin Pract Oncol 5(6):324-35 [2008]]). 안트라시클린 단독은 심근병증 및 울혈성 심부전을 초래하는 심독성을 유발하는 것으로 잘 이해된다 (문헌 [Annals of Internal Medicine 125(1):47-58 [1996]]). 조합된 안트라시클린 및 헤르셉틴®

(트라스투주맙)과 관련된 손상은 손상된 심장 조직의 자연적인 복구 과정에서 Her2의 정상적인 기능의 파괴로 인한 것일 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 효과가 헤르셉틴®

(트라스투주맙)으로 치료된 환자에서 심장 조직 상에서 때때로 관찰되고, Her2 활성이 심장 세포 성장과 연관될 가능성이 있기 때문에 (문헌 [Freedman, N. J., et al., J Am Coll Cardiol 48(7):1448-50 [2006]]), Her2 효능제가 심장 질환을 갖는 환자에게 이로울 수 있을 것으로 추론하였다. 최근에, 이전의 정설과는 대조적으로, 심근 세포가 성인 삶의 과정 동안 계속 증식한다는 것이 명확하게 밝혀졌다 (문헌 [Bergmann, O., R. et al., Science 324(5923):98-102 (2009)]; [Bersell, K., S., et al., Cell 138(2):257-70 (2009)]; [Doggen, K., et al., J Mol Cell Cardiol 46(1):33-8 [2009]]). 따라서, 본 발명자들은 트라스투주맙-유래의 효능제 비스-Fab 분자, 예컨대 비스-Fab 1325가 성인 심장근육세포의 성장에서 Her2를 활성화시킬 수 있고, 이에 따라 특정 유형의 심장 질환의 치료를 위한 가능한 치료 리드를 제공한다고 제안하였다.

[0499] 몇몇 상이한 세포 유형, 조직 및 세포 과정은 또한 Her2 및 상이한 HER 패밀리 구성원의 활성화에 의존한다. 이들 수용체는 다수의 중요한 신호전달 기능이 관찰되는 리간드의 뉴레귤린 패밀리에 의해 활성화된다. 이들 세포 유형, 조직 및 과정은 근육 세포, 심근 세포, 슈반 세포, 펩지교세포, 신경근육 시냅스, 두개 감각 뉴런, 운동 및 감각 뉴런, 말초 및 두개 신경, 교감 뉴런, 피질 뉴런 전구체, 소뇌 과립 세포, 시상하부, 부교감신경 조직, 해마, 심장 조직, 심장 판막의 발생, AV-중격, 심장근육세포의 성장, 복구 및 생존, 혈관신생, 폐 상피의 발생, 근육형성, 생식선 발생과 위 상피의 증식을 포함한다. 문헌 [Falls, D. L. Exp Cell Res 284(1):14-30 (2003)]; [Falls, D. L. J. Neurocytol. 32(5-8):619-47 (2003)]; [Britsch, S. Adv Anat Embryol Cell Biol 190:1-65 (2007)]. 따라서, 이들 세포 유형은 Her2 효능제에 대한 추가의 잠재적 표적이다. 추가로, 인간 배아 줄기 세포 (hECS)의 유지 및 분화는 Her2 활성에 의존하고, Her2 효능제 분자의 또 다른 중요한 적용을 제공할 수 있다 (문헌 [Jones, F. E., et al., Oncogene 18(23):3481-90 (1999)]; [Leone, F., E., et al., J Leukoc Biol 74(4):593-601 (2003)]).

[0500] 본 발명자들은 또한 이러한 기술이 일반적으로 추가의 분자 표적에 대한 비스-Fab의 개발에 의해 적용가능한지 여부를 조사하였다. 본 발명자들은 Fc γ RIIb 및 항-Fc ε RI α를 표적화하는 비스-Fab을 합성하고, Fc ε RI α 및 Fc γ RIIb를 둘 다 발현하는 RBL 세포로부터의 히스타민 방출에 대한 각각의 효과를 시험하였다. 결과는 상이한 비스-Fab이 소정 범위의 활성을 나타낸다는 것을 보여주었다.

[0501]

또한, 본 발명자들은 비스-Fab의 합성에 사용하기 위해 변형된 가교제를 생성하기 위한 방법을 기재하였다. 본 발명자들은 이러한 변형된 가교제가 생체내에서 반감기를 변형시키기에 유용한 시약, 예컨대 PEG의 첨가에 유용하다는 것을 보여주었다. 본 발명자들은 또한 PEG를 함유하는 비스-Fab이 PEG가 결여된 비스-Fab에 비해 개선된 생체내 혈청 반감기를 갖는다는 것을 보여주었다. 최종적으로, 생체내 마우스 이종이식 모델을 사용하여, 본 발명자들은 PEG를 함유하는 비스-Fab이 고형 종양을 표적화하는 치료 후보로서 그의 잠재력을 유효화하는 종양 세포 성장을 억제하는데 효과적이었다는 것을 보여주었다.

[0502]

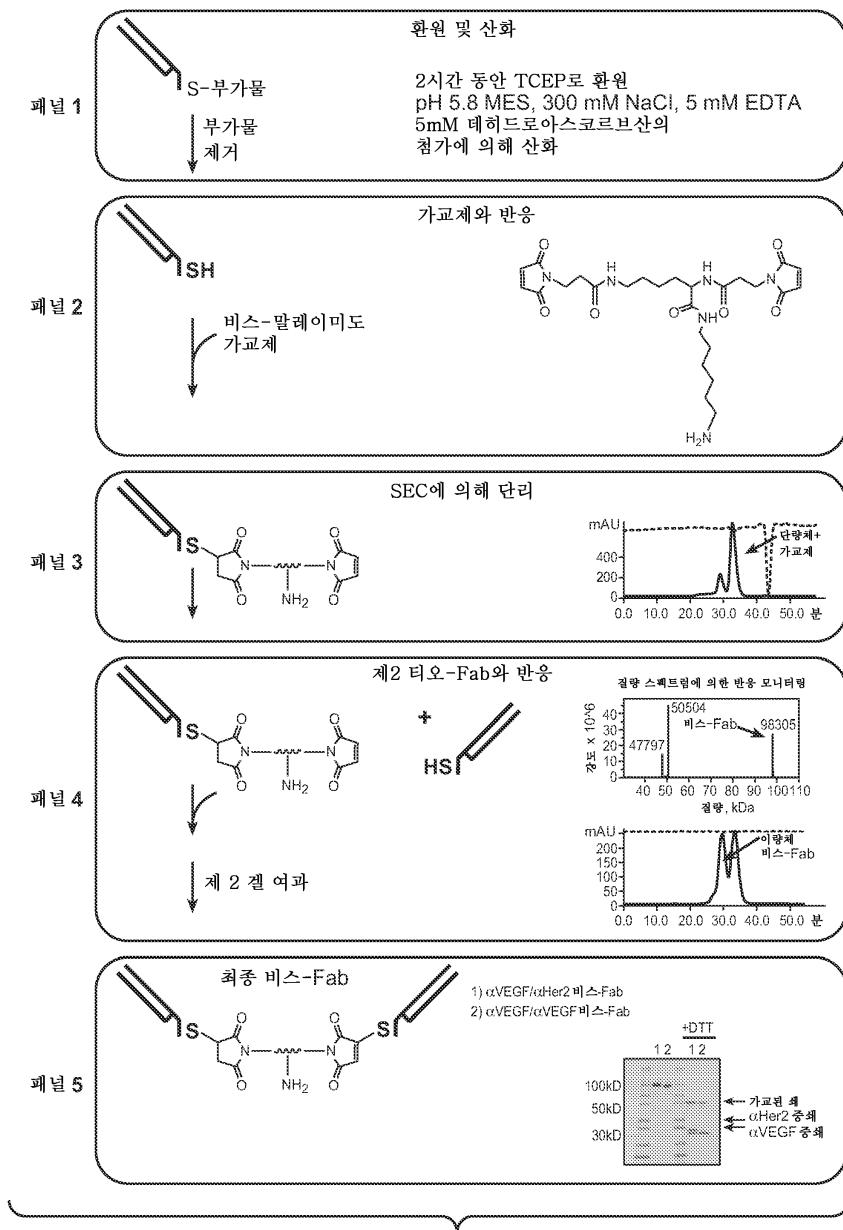
본 발명자들이 비스-Fab이라고 칭하는 항체-유사 분자의 합성에 대해 여기서 기재된 이러한 새로운 접근법은 분자 요법을 설계하고 기본적인 연구를 보조하는데 유용한 새로운 도구일 수 있다. 스크리닝 방법으로서, 이 기술은 예를 들어 주어진 적용을 위해 가장 유용한 이중특이적 항체 조합의 확인에 적용될 수 있거나 또는 수용체 신호전달 경로를 프로빙하기 위한 도구로서 적용될 수 있다. 이는 또한 발견을 위한 분자를 신속하고 강건하게 생성하는데 유용하고, 다르게는 천연 이뮤노글로불린 구조와 가능하지 않을 수 있는 광범위한 활성을 생성하기 위한 새로운 기회를 제공한다.

[0503]

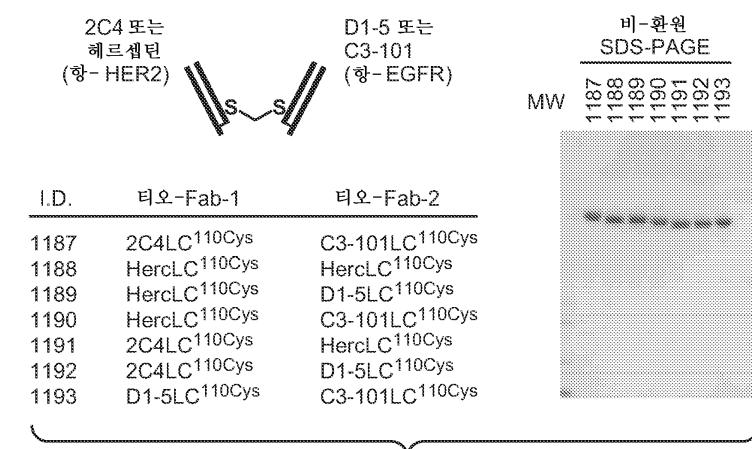
본 발명은 본 발명의 몇몇 측면의 설명으로 의도되는 실시예에 개시된 구체적인 실시양태에 의해 범위가 제한되지 않을 것이며, 기능상으로 동등한 임의의 실시양태가 본 발명의 범위내에 포함된다. 사실상, 본원에 제시되고 기재된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형은 당업자에게 명백하게 될 것이며, 첨부된 특허청구범위의 범위내에 포함되도록 의도된다.

도면

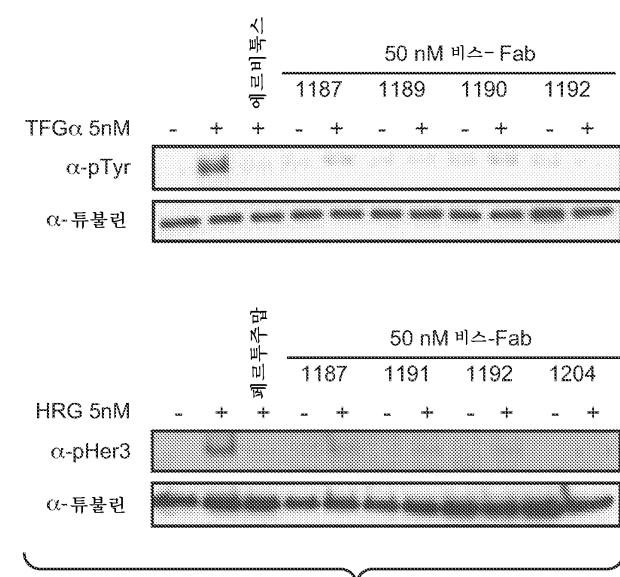
도면1



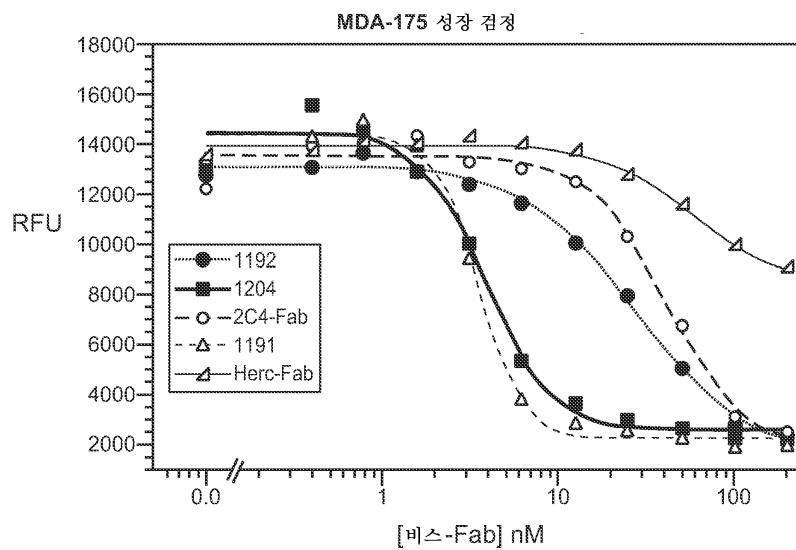
도면2a



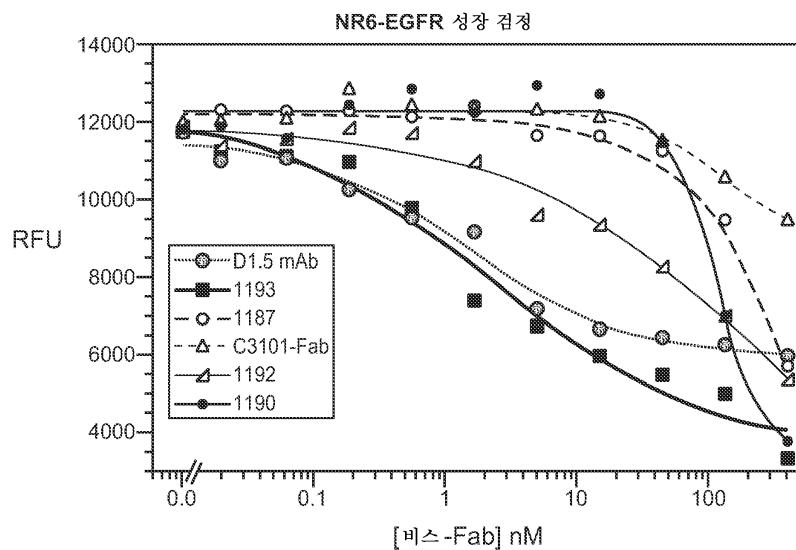
도면2b



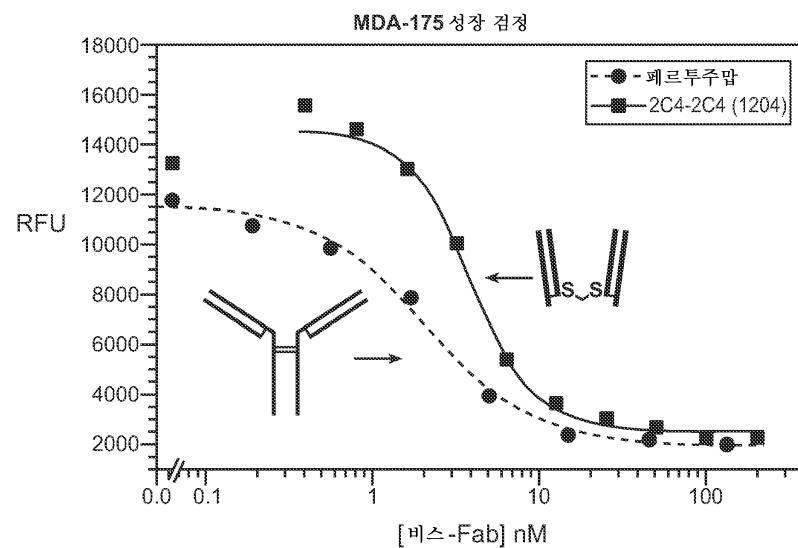
도면2c



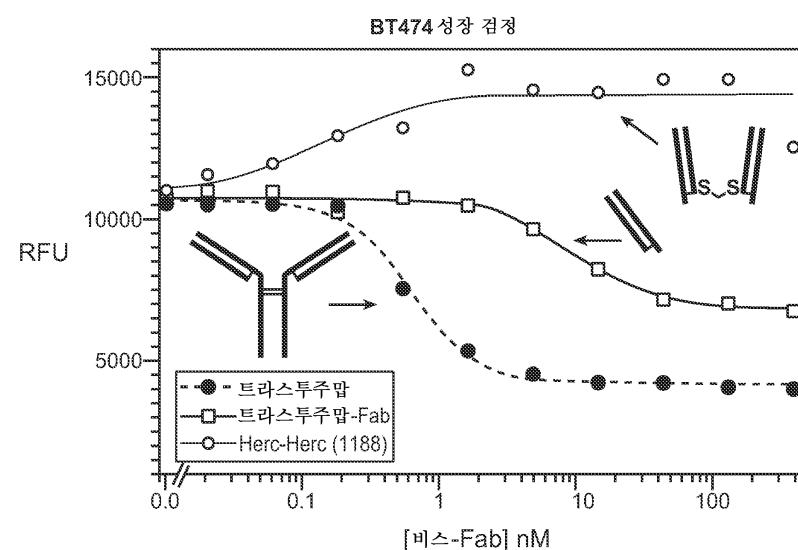
도면2d



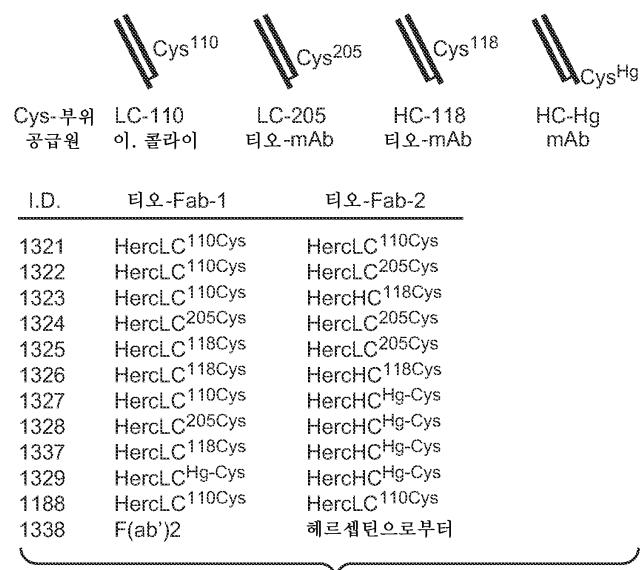
도면2e



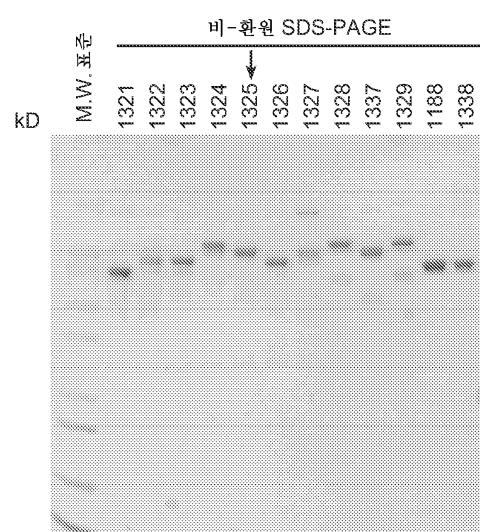
도면2f



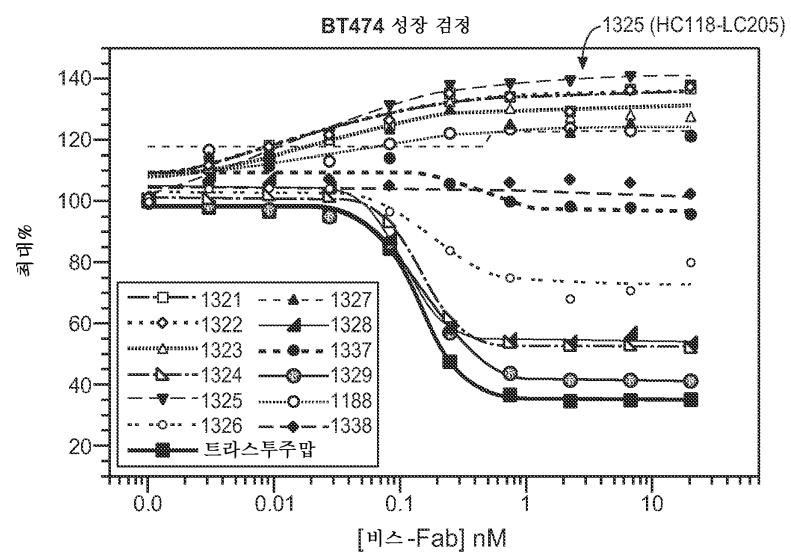
도면3a



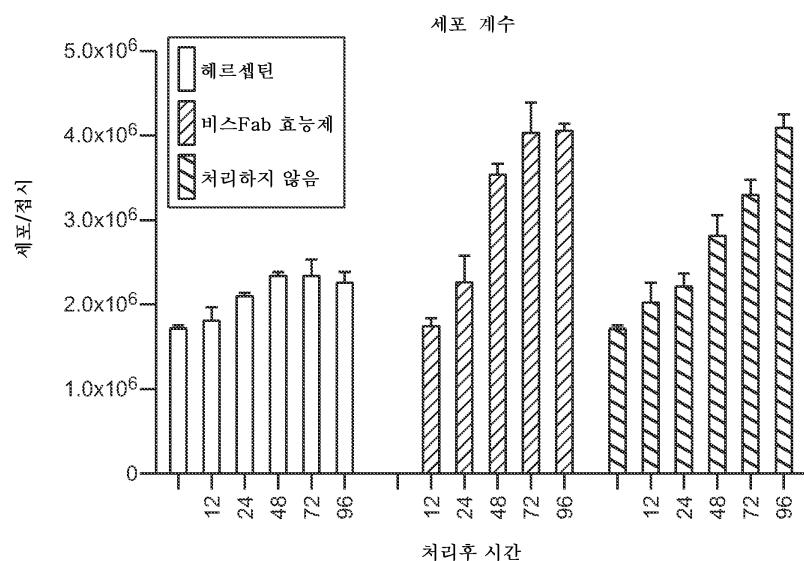
도면3b



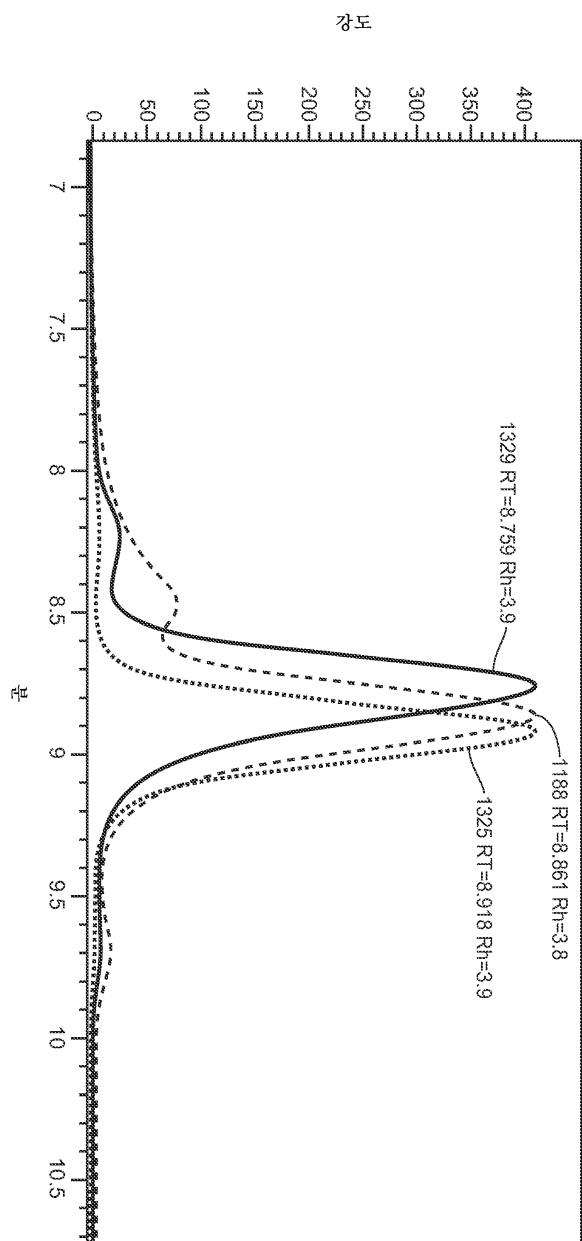
도면3c



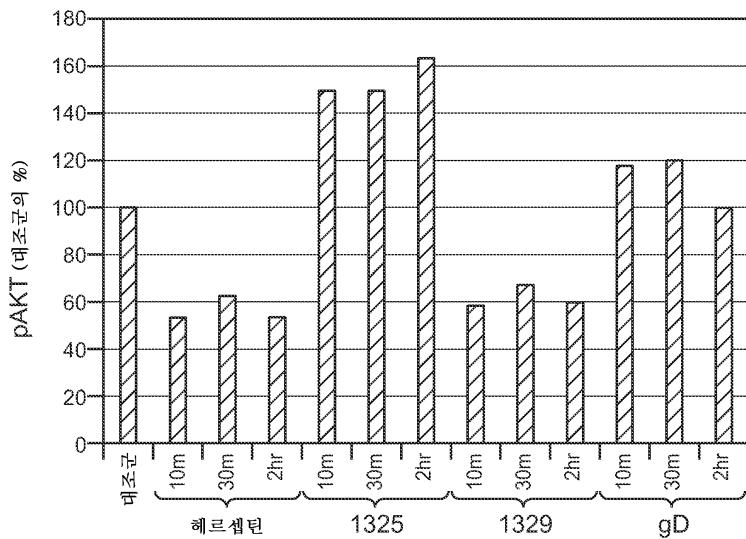
도면3d



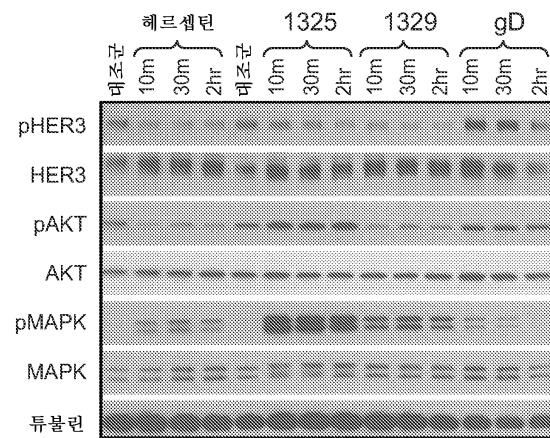
도면4



도면5a



도면5b



도면5c

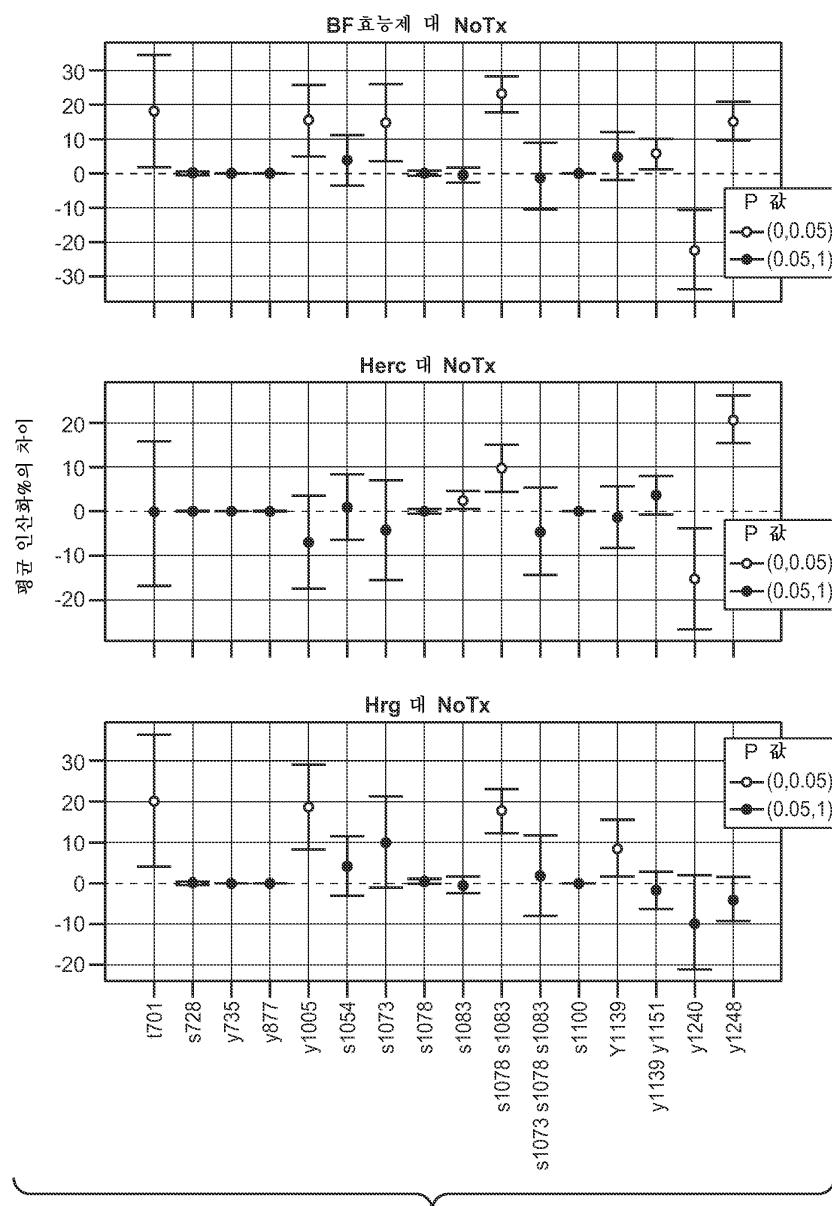
부위	펩타드	펩타드 서열	정량 AQUA 또는 표지 비활유?	기초 %Phos \pm SD	체로셀린 %Phos \pm SD	비스- <i>Fab</i> %Phos \pm SD	체레글린 %Phos \pm SD
1701	690-713	LQQTEI ¹ VEPL ² PSGAM ³ PNGQAMR (서열 28)	AQUA	54.8 \pm 5.6	47.8 \pm 4.5	66.3 \pm 1.5	68.5 \pm 3.4
s728	725-736	VIGSGA ¹ FGTV ² K (서열 29)	AQUA*	0.59 \pm 0.20	0.65 \pm 0.08	0.59 \pm 0.11	0.54 \pm 0.05
y735	725-736	VGSGA ¹ FGTV ² K (서열 29)	AQUA	0.09 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01
y877	869-883	LLDIDETE ¹ WADGGK (서열 30)	AQUA	4.4 \pm 0.9	4.2 \pm 0.2	6.5 \pm 0.4	3.8 \pm 0.8
y1005	986-1006	FVVIQHEDLGPASPLDSTIFR (서열 31)	AQUA	29.6 \pm 4.7	22.7 \pm 5.3	44.9 \pm 3.0	48.3 \pm 4.1
s1054	1054-1072	SGGGDT ¹ LGLEP ² SEE ³ APR (서열 32)	AQUA	90.8 \pm 1.7	88.8 \pm 1.5	91.4 \pm 0.4	91.9 \pm 0.6
s1054 및 s1066	1073-1072	SGGGDT ¹ LGLEP ² SEE ³ APR (서열 32)	없음	NA	NA	NA	NA
s1073	1073-1096	SPLAPSEGAGGSDFVFDGLGMAAK (서열 33)	AQUA*	16.9 \pm 2.1	8.8 \pm 1.7	31.6 \pm 6.1	27.0 \pm 5.3
s1078	1073-1096	SPLAPSEGAGGSDFVFDGLGMAAK (서열 33)	AQUA	0.82 \pm 0.15	1.01 \pm 0.42	0.84 \pm 0.10	1.05 \pm 0.23
s1083	1073-1096	SPLAPSEGAGGSDFVFDGLGMAAK (서열 33)	AQUA*	5.9 \pm 0.64	8.6 \pm 1.1	5.3 \pm 0.5	5.4 \pm 1.0
s1073 및 s1078	1073-1096	SPLAPSEGAGGSDFVFDGLGMAAK (서열 33)	AQUA*	3.9 \pm 1.1	3.6 \pm 0.7	6.2 \pm 1.2	5.8 \pm 0.9
s1078 및 s1083	1073-1096	SPLAPSEGAGGSDFVFDGLGMAAK (서열 33)	AQUA	22.7 \pm 2.2	30.5 \pm 3.5	28.0 \pm 3.3	26.3 \pm 2.7
s1073 s1078 및 s1083	1073-1096	SPLAPSEGAGGSDFVFDGLGMAAK (서열 33)	AQUA*	9.6 \pm 2.8	8.5 \pm 5.9	10.5 \pm 2.1	13.2 \pm 1.9
s1100	1097-1111	GQQLPLTHDPSPLQR (서열 34)	AQUA	0.87 \pm 0.08	0.92 \pm 0.16	0.82 \pm 0.05	0.88 \pm 0.06
y1139	1112-1153	YSEDP ¹ TVPL ² PS ³ TDGYVAPLTCSP	표지 비활유	76.8 \pm 3.4	75.5 \pm 3.9	82.4 \pm 3.9	85.5 \pm 2.4
s1139 및 s1151	1112-1153	QPEFVNQPD ¹ RFQPPSPR (서열 35)	표지 비활유	6.8 \pm 2.4	10.7 \pm 2.5	12.1 \pm 4.4	4.9 \pm 1.9
#1166	1154-1171	EGP ¹ PA ² ARRAGA ³ T ⁴ ERPK (서열 36)	없음	NA	NA	NA	NA
#1240/42	1239-1255	GPA ¹ ENPEV ² YGLDVPV (이를 중 하나) (서열 37)	AQUA*	40.6 \pm 4.6	25.5 \pm 6.1	18.3 \pm 2.9	30.7 \pm 5.5
y1248	1239-1255	GPTAENPEM ¹ GLDVPV (서열 38)	AQUA	17.8 \pm 1.0	38.8 \pm 2.0	32.7 \pm 3.0	13.8 \pm 0.7

* = 사용된 힙성 펩타드는 동일한 펩타드 상에 또 다른 phos 부위를 갖는다

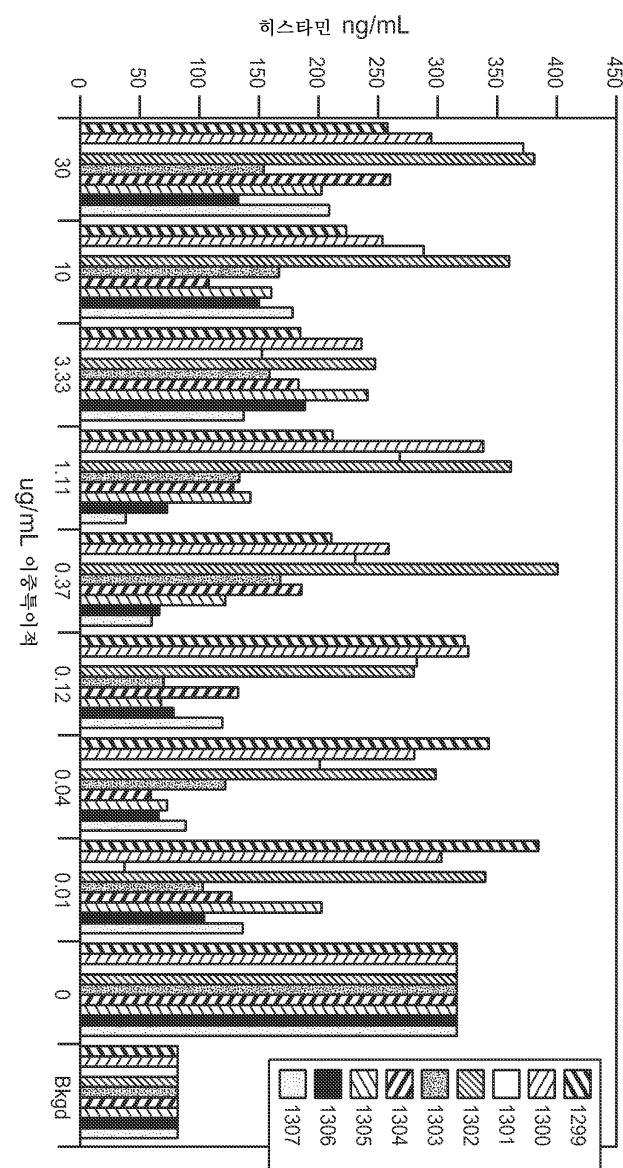
도면5d

+13C +15N 침가 질량 ERBB2 합성 패티드				증 단일동위원소
				MH ⁺
5	1	6.0138	VLGSGAFT <u>V</u> YK	1204.6605 (서열 29)
5	1	6.0138	VLGSGAFT <u>V</u> K	1284.6268 (서열 29)
4	2	6.0075	LLDIDETEYHAD <u>GGK</u>	1681.7885 (서열 30)
4	2	6.0075	LLDIDETE <u>y</u> HAD <u>GGK</u>	1761.7548 (서열 30)
5	1	6.0138	EGPLPAARPAGATLER <u>PK</u>	1837.0323 (서열 36)
5	1	6.0138	EGPLPAARPAGA <u>L</u> ER <u>PK</u>	1916.9986 (서열 36)
5	1	6.0138	SGGGDLTLGLEPSEE <u>A</u> PR	1919.9225 (서열 32)
5	1	6.0138	sGGGDLTLGLEPSEE <u>A</u> PR	1999.8888 (서열 32)
6	1	7.0171	GLQSLPTHD <u>PSP</u> <u>L</u> QR	1652.8827 (서열 34)
6	1	7.0171	GLQsLPTHD <u>PSP</u> <u>L</u> QR	1732.8491 (서열 34)
5	1	6.0138	GTPTAENPEYLG <u>LDV</u> <u>P</u> V	1777.8887 (서열 37)
5	1	6.0138	GTPTAENPE <u>y</u> L <u>GLD</u> V <u>P</u> V	1857.8550 (서열 37)
5	1	6.0138	LLQETELVEPLTPSGAM <u>P</u> NQAQM <u>R</u>	2659.3462 (서열 28)
5	1	6.0138	LLQETELVEPL <u>P</u> SGAM <u>P</u> NQAQM <u>R</u>	2739.3125 (서열 28)
6	1	7.0171	FVVIQNEDLGPAS <u>P</u> <u>L</u> DSTFYR	2375.1991 (서열 31)
6	1	7.0171	FVVIQNEDLGPAS <u>P</u> <u>L</u> DSTFyR	2455.1654 (서열 31)
6	1	7.0171	SPLAPSEGAGSDVFD <u>G</u> D <u>L</u> GMGA <u>AK</u>	2256.0562 (서열 33)
6	1	7.0171	SPLAPsEGAGSDVFD <u>G</u> D <u>L</u> GMGA <u>AK</u>	2336.0225 (서열 33)
6	1	7.0171	SPLAPsEGAG <u>s</u> DVFD <u>G</u> D <u>L</u> GMGA <u>AK</u>	2415.9888 (서열 33)

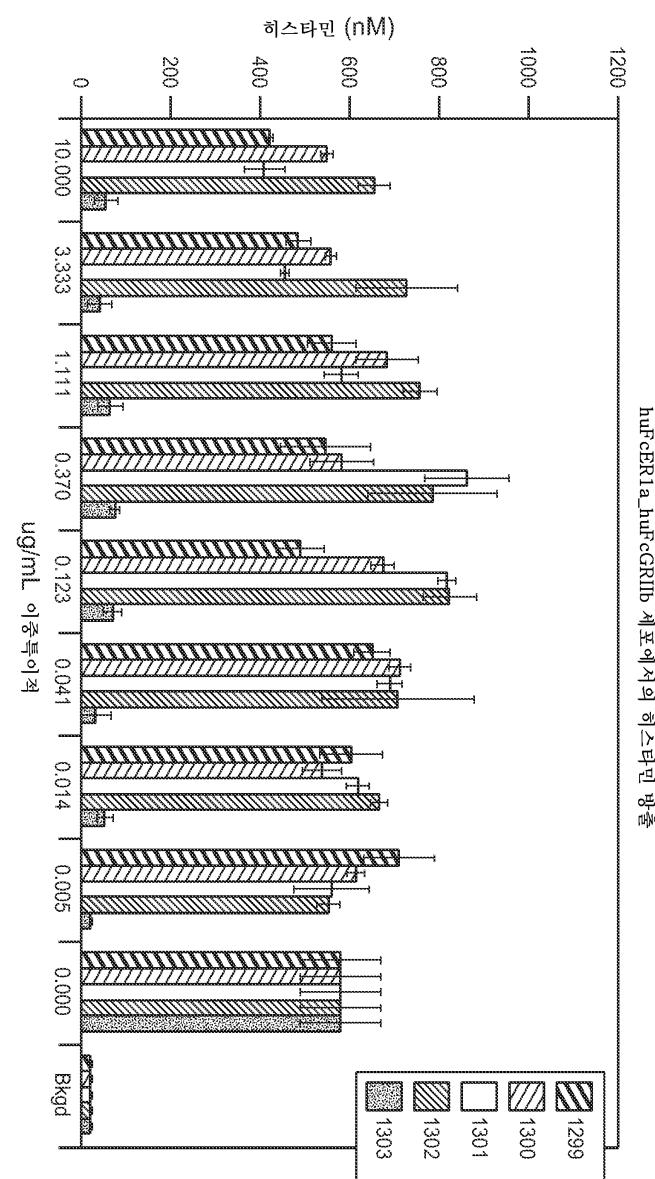
도면5e



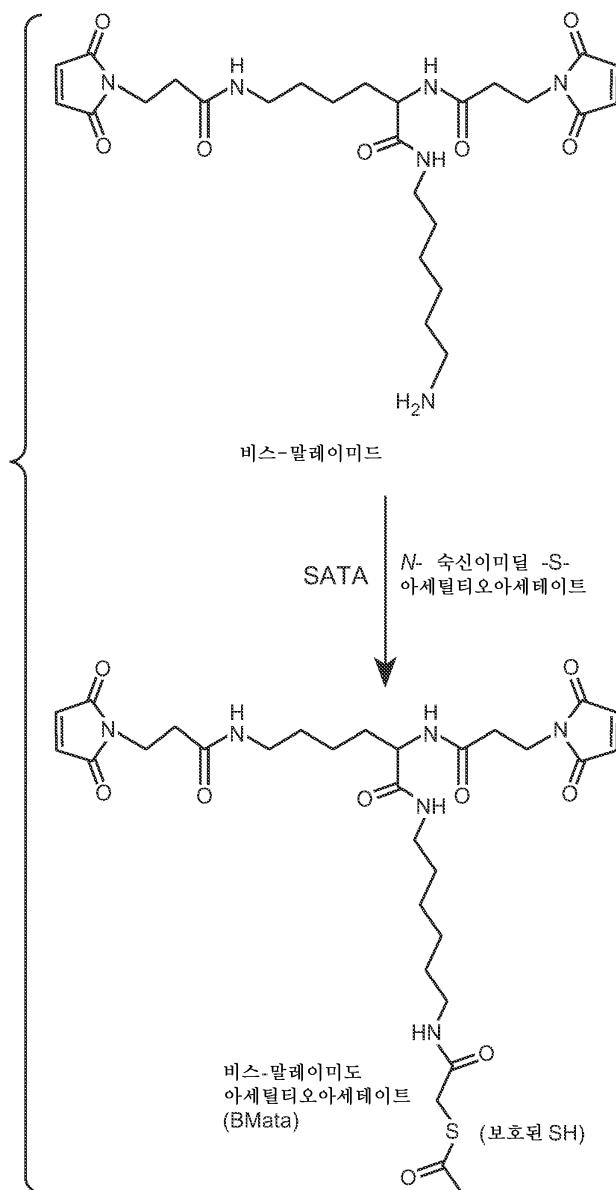
도면6a



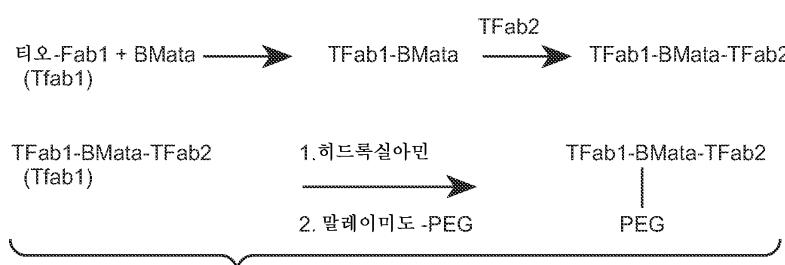
도면6b



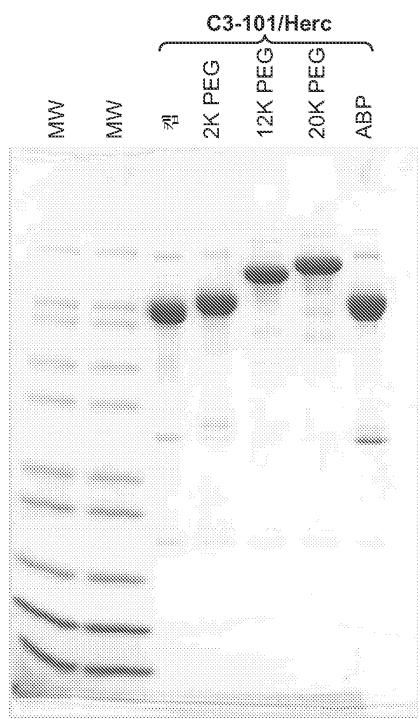
도면7a



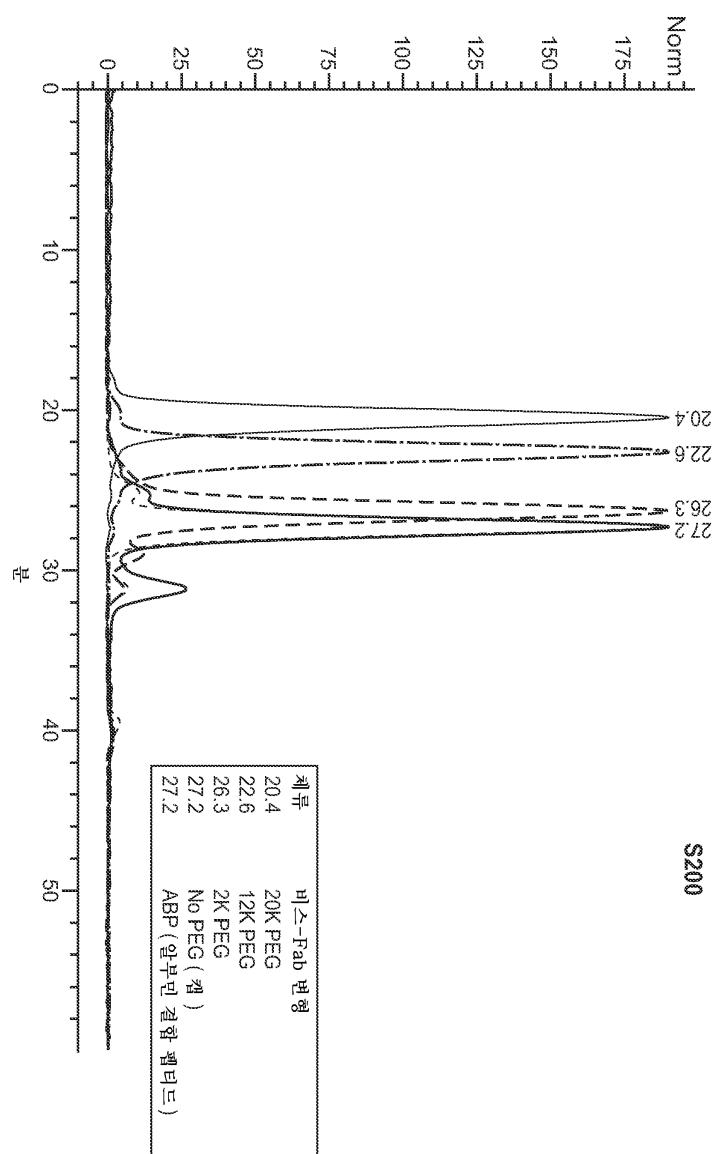
도면7b



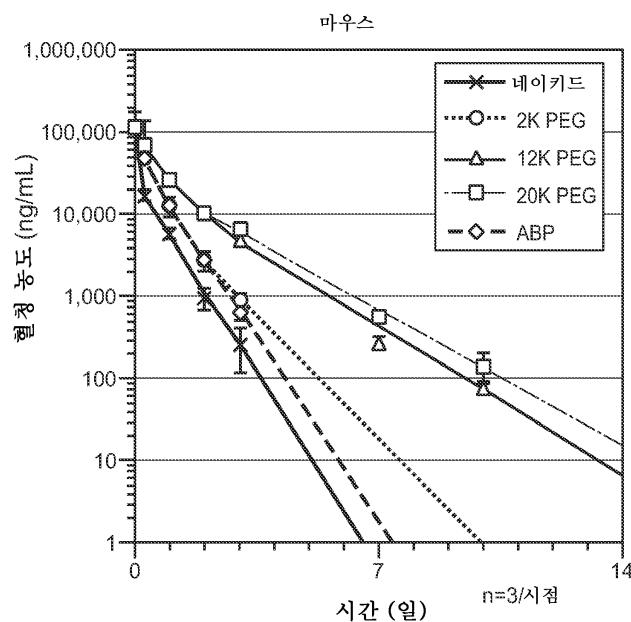
도면8a



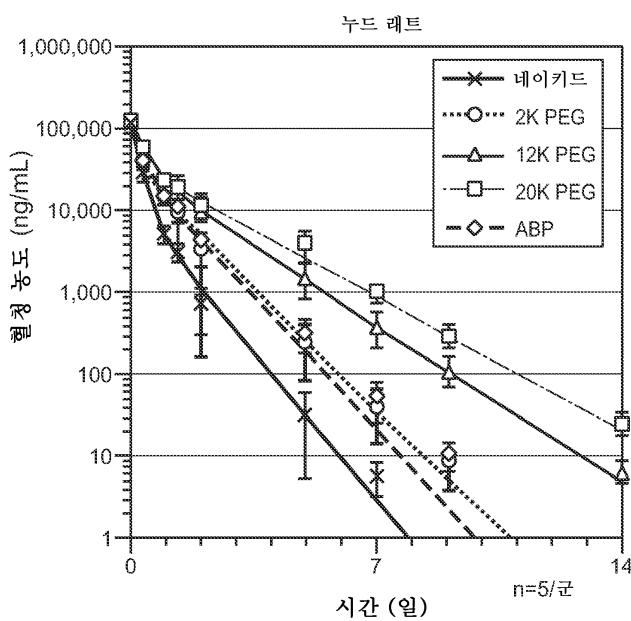
도면8b



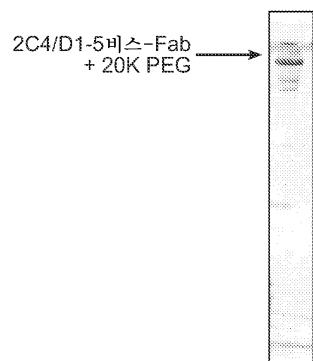
도면9a



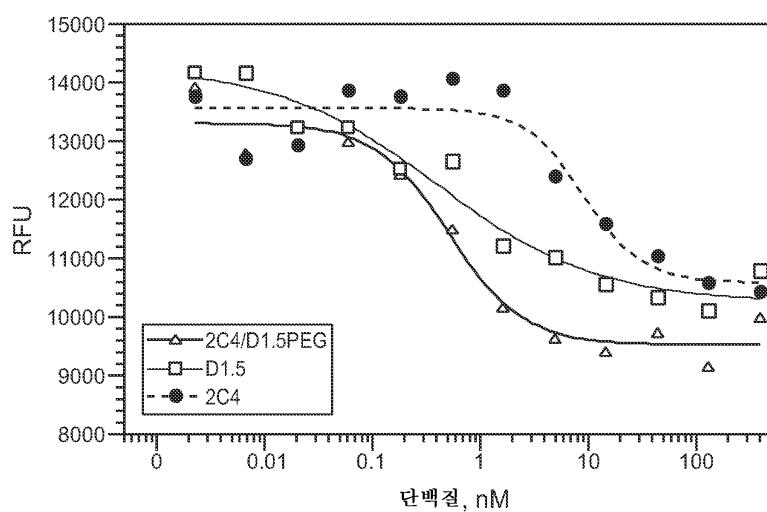
도면9b



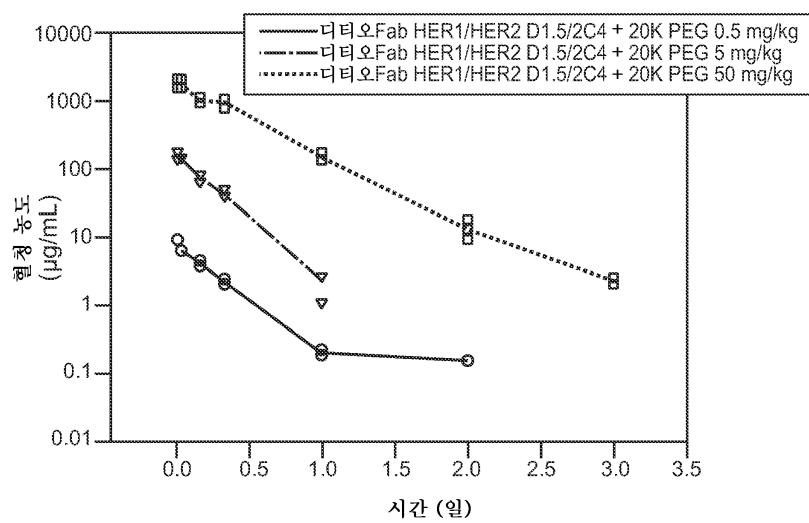
도면10a



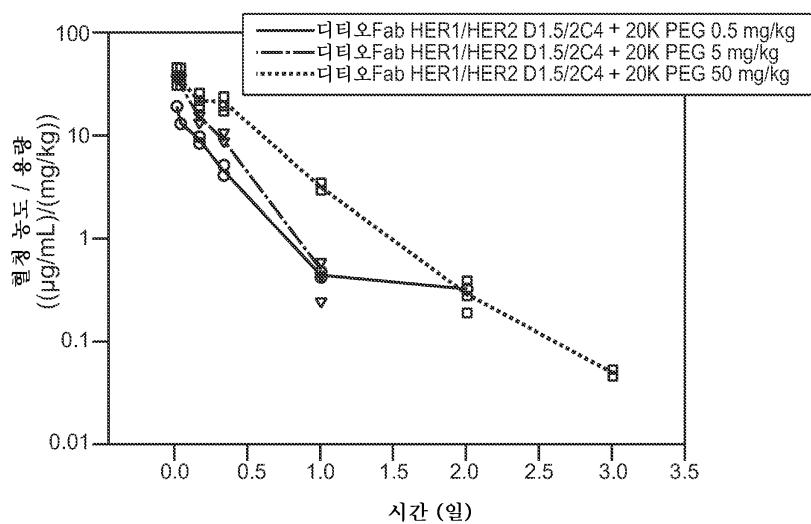
도면10b



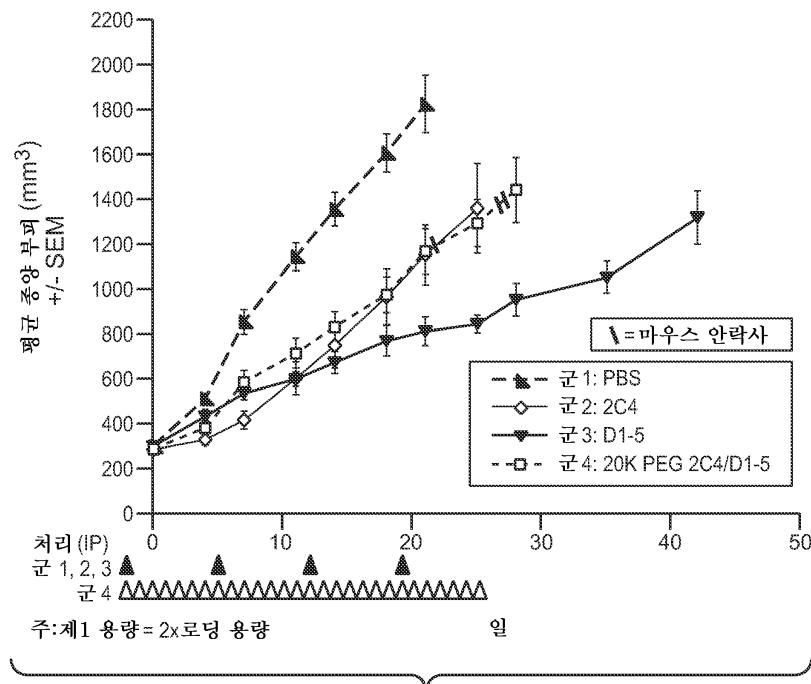
도면11a



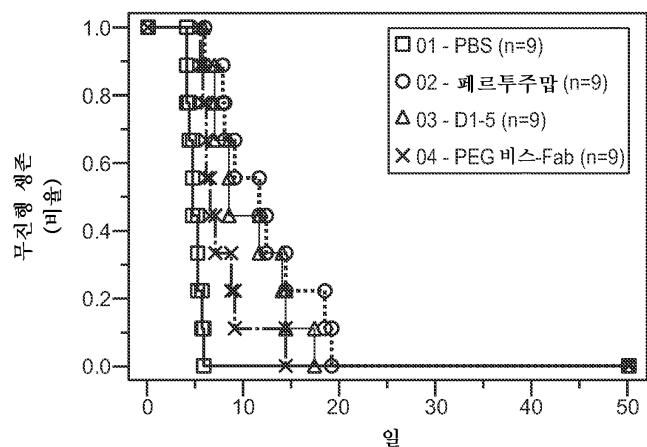
도면11b



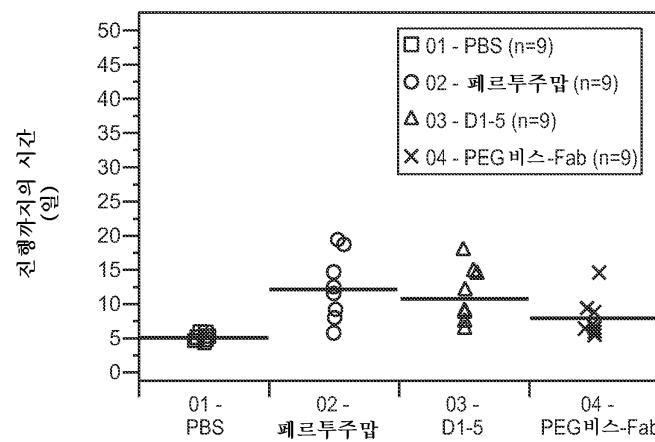
도면12



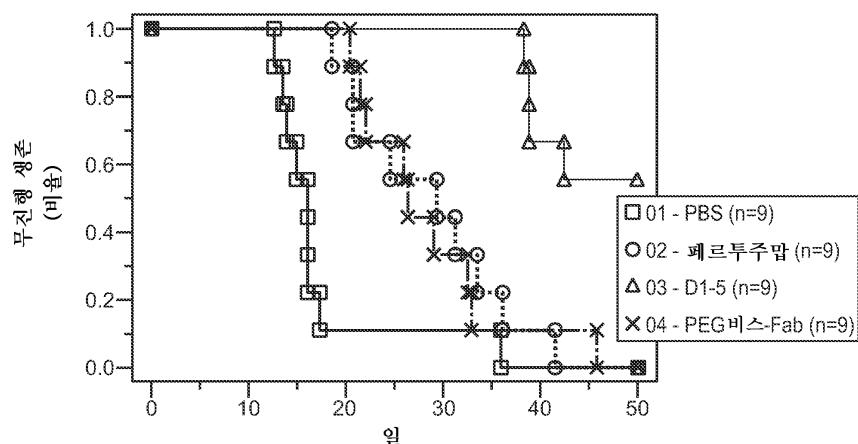
도면13a



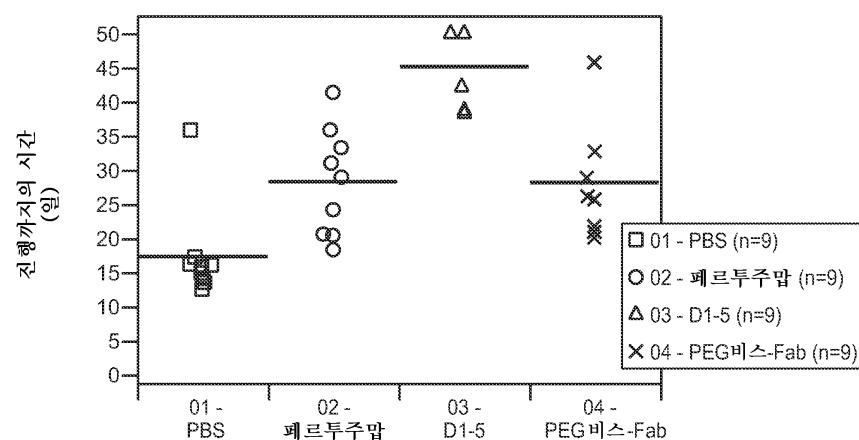
도면13b



도면14a



도면14b



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.;

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG; et al.

<120> MULTISPECIFIC ANTIBODIES, ANTIBODY ANALOGS, COMPOSITIONS, AND

METHODS

<130> P4377R1 WO

<140><141><150> 61/346,566

<151> 2010-05-20

<150> 61/267,006

<151> 2009-12-04

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: HercLC wild-type

polypeptide

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210> 2			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic			
polypeptide			
<400> 2			

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 4

<211> 450

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: HerchC wild-type

polypeptide

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

445

Gly Lys

450

<210> 5

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly Lys		
450		
<210> 6		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Unknown		
<220><223> Description of Unknown: 2C4LC wild-type		
polypeptide		
<400> 6		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly		
20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
160		

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 7

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser G1y Ser G1y Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 8

<211> 227

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: 2C4HC (VH-CH1) wild-type

polypeptide

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr

225

<210> 9

<211> 222

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: 5A6HC (VH-CH1) wild-type

polypeptide

<400> 9

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Pro Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50	55	60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser			
65	70	75	80
Val Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val			
100	105	110	

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser			
115	120	125	
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys			
130	135	140	
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu			
145	150	155	160
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu			
165	170	175	

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr			
180	185	190	
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val			
195	200	205	
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	

<210> 10

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 10

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala			
20	25	30	

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Pro Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

Ser Ser Cys Lys Thr Thr Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser

115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu

145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

210 215 220

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: 5A6LC wild-type

polypeptide

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20	25	30
----	----	----

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile

35	40	45
----	----	----

Tyr Ala Ala Ser Ala Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly

50	55	60
----	----	----

Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Leu

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100	105	110
-----	-----	-----

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115	120	125
-----	-----	-----

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130	135	140
-----	-----	-----

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180	185	190
-----	-----	-----

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195	200	205
-----	-----	-----

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ala Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<211> 226

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: 22E7HC (VH-CH1) wild-type
polypeptide

<400> 13

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Asn Asn Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Asn Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Arg Ser Val Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Leu Trp Tyr Arg Ala Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr

225

<210> 14

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 14

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Thr Ile Ser Gly Asn Asn Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Asn Leu

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Arg Ser Val Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ser Leu Trp Tyr Arg Ala Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Lys Thr Thr Gly Pro Ser Val Phe Pro

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

His Thr

225

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: 22E7LC wild-type

polypeptide

<400> 15

Asp Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Ser Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
160		
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 16

Asp Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Ser Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 17

<211> 228

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: D1-5HC (VH-CH1) wild-type

polypeptide

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asn

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115	120	125
-----	-----	-----

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130	135	140
-----	-----	-----

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165	170	175
-----	-----	-----

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180	185	190
-----	-----	-----

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195	200	205
-----	-----	-----

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210	215	220
-----	-----	-----

Asp Lys Thr His

225

<210> 18

<211> 214

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: D1-5LC wild-type

polypeptide

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 20

<211> 229

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: C3-101HC (VH-CH1) wild-type
polypeptide

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45Gly Thr Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg Leu Ala Val Gly Val Phe Ala Asn Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210	215	220	
Cys Asp Lys Thr His			
225			
<210> 21			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> Unknown			
<220><223> Description of Unknown: C3-101LC wild-type			
polypeptide			
<400> 21			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala			
20 25 30			
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Arg			
85 90 95			
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145 150 155 160			
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 22

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 23

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp

1 5 10 15

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe

20 25 30

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 24

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe

20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 25

Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe

20

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 26

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 27

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 28

Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala

1 5 10 15

Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg

20

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 29

Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys

1 5 10

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 30

Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys

1 5 10 15

<210> 31

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 31

Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp

1 5 10 15

Ser Thr Phe Tyr Arg

20

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 32

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu

1 5 10 15

Ala Pro Arg

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 33

Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly

1 5 10 15

Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys

20

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 34

Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg

1 5 10 15

<210> 35

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 35

Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr

1 5 10 15

Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro

20 25 30

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg

35 40

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 36

Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg

1 5 10 15

Pro Lys

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 37

Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro

1 5 10 15

Val

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 38

Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro

1 5 10 15

Val